



Hinc patriam sustinet

**Instituto Superior de Agronomia**  
**Universidade Técnica de Lisboa**

# **Análise a nível molecular da interacção pedrado-macieira num hospedeiro resistente e num hospedeiro susceptível**

**Sofia Gomes Melvill de Araújo**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Agronómica**

Orientador: Doutora Mariana da Silva Gomes Mota

## **Júri:**

**Presidente:** Doutora Cristina Maria Moniz Simões Oliveira, Professora Associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

**Vogais:** Doutora Ana Paula Ferreira Ramos, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutora Mariana da Silva Gomes Mota, Investigadora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Lisboa, 2011



## **Agradecimentos**

À Dr.<sup>a</sup> Mariana Mota minha orientadora, por todo o apoio e amizade ao longo deste trabalho e por acreditar em mim. Agradeço por ter sugerido um tema que lhe é tão especial e pelo voto de confiança que me deu para continuar um bocadinho daquilo que é seu.

À Eng.<sup>a</sup> Luísa Valério por toda ajuda e disponibilidade para cuidar das minhas plantas.

À Dr.<sup>a</sup> Luísa Carvalho pela ajuda na compreensão dos resultados.

À Eng.<sup>a</sup> Carla Fernandes (EcoFrutas) e ao Eng.<sup>o</sup> João Abreu (Sociedade Agrícola da Terra da Eira) pela cedência de material usado neste trabalho.

Aos colegas e amigos Sara, Sandra e Jorge pelos momentos bem passados no laboratório.

Aos amigos do ISA pelos bons momentos que se passaram ao longo destes 5 anos.

Às minhas amigas do IST Marta e Sílvia pela amizade que ficou, mesmo depois da mudança de curso.

À Joana, Sara B., Nádia e ao Pedro pela amizade de muitos anos e por estarem sempre lá para mim.

À Sara C. por ser uma grande amiga e por me dar toda a força necessária para acabar este trabalho.

A todos os meus amigos, o meu muito obrigada.

À minha prima Carolina por ser como uma segunda irmã e por ter sempre uma palavra a dar quando é preciso.

E por último e porque os últimos são para mim os primeiros, aos meus Pais Pedro e Marisa e à minha irmã Maria por todo o apoio, amizade, compreensão entre muitos outros ao longo de todos estes anos, sem eles não seria possível. Muito Obrigada!

Todos foram directa ou indirectamente importantes na realização e conclusão deste trabalho.

## Resumo

Este trabalho visou a análise do padrão de expressão de genes que poderão estar relacionados com a resistência da macieira ao pedrado (*Venturia inaequalis*). Esta análise foi realizada num genótipo susceptível (descendentes de 'Royal Gala') e numa cultivar resistente ('Florina') por RT-qPCR após inoculações artificiais com suspensões conidiais de pedrado (água como controlo). Para o hospedeiro susceptível, analisou-se a interacção às 48, 72 e 96 h, no resistente apenas se analisou às 96h. A análise do padrão de expressão de genes relacionados com a síntese da cutícula (M10) e da parede celular (M9), genes de resistência (M6) e genes de resposta a stresses bióticos e abióticos (M3, N54, N3021), anteriormente identificados, revelou que estes são sobre-expressos nas amostras infectadas nos dois hospedeiros, ocorrendo a sobre-expressão a níveis muito superiores na cultivar resistente 'Florina' (para M9, M10 e N3021). A aplicação da metodologia RACE permitiu ampliar a extremidade 5' do fragmento M9 em 851 pb. A análise desta sequência mais longa veio reforçar a homologia já anteriormente estabelecida com um gene que codifica a *Celulose sintase*, envolvido na síntese de paredes celulares e que pode estar relacionado com a resposta de defesa da planta quando esta é atacada por *Venturia inaequalis*.

**Palavras-chave:** interacção parasita-hospedeiro, *Malus x domestica*, pedrado, PCR em tempo real

## Abstract

Title: Analysis at molecular level of the apple-scab interaction in a resistant and susceptible host

This work focused on the study of the expression patterns of genes that may be related with defense responses to apple scab (*Venturia inaequalis*). This analysis was conducted in a susceptible ('Royal Gala' seedlings) and a resistant host ('Florina') by RT-qPCR following artificial inoculations with conidial scab suspensions (using water as control). For the susceptible host, the interaction was analysed at 48, 72 e 96 h, whereas for the resistant host, only the moment of 96 h upon inoculation was studied. Expression pattern analysis of genes related with cuticle (M10) and cell wall synthesis (M9), resistance genes (M6) and genes involved in biotic and abiotic stress responses (M3, N54, N3021), previously identified, showed that these genes are upregulated in infected samples in both genotypes, with higher upregulation levels in the resistant cultivar 'Florina' (for M9, M10 and N3021). The use of RACE methodology enabled the extension of the known coding sequence of M9 in the 5' direction in 851 bp. The analysis of the long sequence reinforced the homology previously established with a gene coding for a *Cellulose synthase*, involved in cell wall synthesis and that might be related to plant defense response upon apple scab attack.

**Keywords:** host-parasite interaction, *Malus x domestica*, apple scab, real-time PCR.

## Extended abstract

Title: Analysis at molecular level of the apple-scab interaction in a resistant and susceptible host

Apples are the one of the most important crops worldwide. The broad spectrum of cultivars available, adapted to different soil and climatic conditions, enables the successful growth worldwide. Thus, the most important constraints to apple production remain the phytopathogens, agents of plagues and diseases (namely apple scab) that are responsible for decreases in produce quality and quantity. Because of their importance, growers have to apply pesticides repeatedly during the growth cycle, which may jeopardize the environment and possibly human life, if aren't used properly. For that, breeding programs are being developed, aiming that in the future there are commercial apple cultivars that are scab resistant.

The host-parasite interaction between apple trees and apple scab is one of the most studied interactions, because of the gene-for-gene relationship. Several genes were found to confer resistance to apple scab, one of them is the *Vf* gene, that was found in the resistant species *Malus floribunda* 821. This was the only one that showed good results when breeders transformed susceptible cultivars, even though new races (6 and 7) of apple scab can overcome this gene (Parisi *et al.*, 1993; Benaouf & Parisi, 2000).

This work focused on the study of the expression patterns of genes that may be related with defense responses to apple scab (*Venturia inaequalis*) at the onset of the infection process. This analysis was conducted in a susceptible ('Royal Gala' seedlings) and a resistant host ('Florina', harboring the *Vf* gene) by RT-qPCR following artificial inoculations with conidial scab suspensions (using water as control). For the susceptible host, the interaction was analysed at 48, 72 e 96 h, whereas for the resistant host, only the moment of 96 h upon inoculation was studied (artificial inoculation had been conducted in a previous study and samples harvested at 96 h after inoculation). As the samples for this study were harvested at early time points, an independent inoculation assay was carried out with the susceptible host and lesion development was followed during one month. The presence of visual symptoms and microscopical observation of germinating conidia and fungal growth in the host confirmed that the inoculation process was efficient and that the 'Royal Gala' seedlings were susceptible, as expected.

The regulation pattern of genes coding for PGIPs (polygalacturonase-inhibiting proteins) was assessed, to confirm host response upon fungal attack, as it is known that *pgip* genes are activated by fungal attack. Expression pattern analysis of genes related with cuticle (M10) and cell wall synthesis (M9), resistance genes (M6) and genes involved in biotic and abiotic stress responses (M3, N54, N3021), previously identified by DDRT-PCR (Mota 2002 and

2008), showed that these genes are upregulated in infected samples in both genotypes, with higher upregulation levels in the resistant cultivar 'Florina' (for M9, M10 and N3021). This distinct behavior may contribute to explain the differences observed at histological levels in susceptible and resistant hosts.

The use of RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) methodology enabled the extension of the known coding region sequence of M9 in the 5' direction in a length of 851 bp. The analysis of the enlarged sequence reinforced the homology previously established with a gene coding for a *Cellulose synthase*, involved in cell wall synthesis and that might be related to plant defense response upon apple scab attack.

**Keywords:** host-parasite interaction, *Malus x domestica*, apple scab, real-time PCR.

## Índice

1 – Introdução	1
2 – Revisão bibliográfica sobre a interacção estabelecida entre a macieira e o pedrado	2
2.1 – O hospedeiro ( <i>Malus x domestica</i> Borkh.)	2
2.1.1 – Importância da macieira no Mundo e em Portugal	2
2.1.1.1 – Produção mundial	2
2.1.1.2 – Produção nacional	2
2.1.2. – Principais cultivares	3
2.2 – O parasita ( <i>Venturia inaequalis</i> (Cke.) Wint.) causador da doença do pedrado da macieira	3
2.3 – Interacção <i>Venturia inaequalis</i> -macieira	4
2.3.1 – Aspectos histológicos da interacção em hospedeiros resistentes e hospedeiros susceptíveis	4
2.3.2– Resistência do hospedeiro e virulência do parasita	6
2.3.2.1 – Resistência ao pedrado dentro do género <i>Malus</i>	6
2.3.2.2 – Níveis de virulência do fungo <i>Venturia inaequalis</i>	8
2.3.3 – Interacção macieira–pedrado no contexto da teoria gene-a-gene	9
2.3.3.1 – Abordagens moleculares para estudo da interacção parasita-hospedeiro – estudos já realizados	11
2.3.3.1.1 – Hibridação Subtractiva	12
2.3.2.1.2 – “Differential display” RT-PCR	12
2.4 – Fragmentos envolvidos na interacção já identificados e sua hipotética função	12
2.4.1 – Genes relacionados com a parede celular	13
2.4.1.1 – Celulose sintase (M9)	13



2.4.1.2 – CUT1 (very-long-chain fatty acid condensing enzyme CUT1) (M10)	14
2.4.2 – Genes de resposta a stresses	14
2.4.2.1 - Glutatioão S-transferase (GST) (M3)	14
2.4.2.2 – Fitoquelatina sintase (PCS) (N54)	15
2.4.2.3 – Citocromo oxidase (N3021)	15
2.4.3 – Genes com função não totalmente conhecida nas plantas	16
2.4.3.1 – Família de proteínas “ <i>Rhomboid</i> ” (N910)	16
2.4.4 – Gene de resistência (M6) – <i>Vr<sub>2</sub></i>	16
2.4.5 – Genes sem função conhecida (M13)	16
2.5 – Avaliação do padrão de expressão em resposta à inoculação com <i>Venturia inaequalis</i> , dos genes anteriormente identificados	17
3 – Material e métodos	18
3.1 – Inoculação artificial de macieiras	18
3.1.1 – Obtenção do material vegetal	18
3.1.2 – Inoculação do material vegetal	18
3.1.3 – Colheita do material vegetal	20
3.1.3.1 – Monitorização microscópica da germinação dos esporos de <i>Venturia inaequalis</i>	20
3.2 – Caracterização molecular da interacção macieira/ <i>Venturia inaequalis</i>	20
3.2.1 – Extracção de RNA para análise do padrão de regulação diferencial de genes já referenciados	20
3.2.1.1 – Método standard de extracção de RNA	20
3.2.1.2 – Método rápido de extracção de RNA para monitorização da evolução da infecção	21
3.2.2 – Quantificação do RNA extraído e obtenção de cDNA	21

3.2.3 – Reacções de amplificação por PCR	22
3.2.4 – Observação de produtos de PCR	23
3.2.5 – RT-qPCR	23
3.2.5.1 – Método matemático para cálculo de Ct ( $\Delta\Delta Ct$ )	24
3.3 – Alongamento de fragmentos utilizando a tecnologia RACE ( <i>Rapid amplification of cDNA ends</i> )	24
3.4 – Clonagem dos fragmentos	25
3.4.1 – Reacção de ligação	25
3.4.2 – Transformação em <i>E. coli</i>	26
3.4.2.1 – Preparação de bactérias competentes	26
3.4.2.2 – Obtenção da molécula recombinante e transformação	26
3.5 – Purificação de DNA plasmídico	27
3.5.1 – PCR de colónias e inoculação em meio líquido	27
3.5.2 – Digestão enzimática	28
3.5.3 – Purificação dos fragmentos amplificados para sequenciação (“QIAquick PCR Purification Kit Protocol”)	28
3.5.4 – Análise das sequências	28
4 – Resultados	29
4.1 – Ensaio de inoculação artificial de plantas de macieira	29
4.1.1 – Obtenção do material vegetal	29
4.1.2 – Inoculação do material vegetal	30
4.2 – Interação parasita-hospedeiro	31
4.2.1 – Monitorização microscópica da germinação dos esporos de <i>Venturia inaequalis</i>	31
4.2.2 – Análise ao nível molecular	31
4.2.2.1 – PCR convencional	31

4.2.2.2 – Real-Time PCR ou qPCR	32
4.3 – Amplificação de regiões codificadas por RACE	35
5 – Discussão de resultados	38
6 – Conclusão	43
7 – Referências bibliográficas	45
8 – Anexos	53

## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Evolução da produção de maçãs, em Portugal (1999-2009).	2
<b>Figura 2:</b> Classificação de Chevalier <i>et al.</i> (1991).	6
<b>Figura 3:</b> Obtenção da cultivar resistente 'Florina' (Sansavini, 1993).	8
<b>Figura 4:</b> Estufins com vasos de plantas descendentes de 'Royal Gala' com 8 meses de idade.	19
<b>Figura 5:</b> Sementes de 'Royal Gala' em caixas de Petri.	29
<b>Figura 6:</b> Tabuleiros alveolados com sementes já germinadas de 'Royal Gala'.	29
<b>Figura 7:</b> Plantas descendentes de 'Royal Gala' transplantadas para vasos de plástico.	30
<b>Figura 8:</b> Conídios de <i>Venturia inaequalis</i> germinados em água de agar 0,6 %, 48 h após a inoculação (10x).	30
<b>Figura 9:</b> Sintomas de pedrado nas folhas de descendentes de 'Royal Gala' (2ª inoculação), um mês após a inoculação.	31
<b>Figura 10:</b> Esporos de <i>Venturia inaequalis</i> corados, 96 h após a inoculação.	31
<b>Figura 11:</b> Resultado do PCR da 1ª inoculação, 96 h após a inoculação.	32

## Índice de Quadros

<b>Quadro 1:</b> A premissa básica da hipótese gene-a-gene (Teoria de Flor) (Beynon, 1997)	10
<b>Quadro 2:</b> Genes já referenciados na interacção <i>Venturia inaequalis</i> -macieira	13
<b>Quadro 3:</b> Iniciadores utilizados nas reacções de PCR	22
<b>Quadro 4:</b> Iniciadores utilizados na técnica RACE	24
<b>Quadro 5:</b> Programa para a reacção RACE	25
<b>Quadro 6:</b> Iniciadores específicos do vector pCRII	27
<b>Quadro 7:</b> Expressão dos genes em estudo (resultado do $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , estas reacções foram realizadas com uma $T_a = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), na variedade susceptível ‘Royal Gala’	33
<b>Quadro 8:</b> Expressão dos genes em estudo (resultado do $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , estas reacções foram realizadas com uma $T_a = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), na variedade resistente ‘Florina’	35
<b>Quadro 9:</b> Grau de homologia da sequência pertencente ao fragmento M9 (celulose sintase) com outras sequências	36

## Lista de abreviaturas

A – adenina

AO – Absorvância óptica do RNA

As – arsénico

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

C – citosina

Cd – cádmio

cDNA – DNA complementar

DDRT-PCR – differential display reverse-transcription PCR

DEPC – dietilpirocarbonato

dH<sub>2</sub>O – água destilada

dH<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> – água tratada com DEPC

dH<sub>2</sub>O<sub>PCR</sub> – água esterilizada

DNA – Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico)

dNTPs – Deoxynucleoside triphosphates (Nucleótidos)

DTT – ditioneitol

*E. coli* – *Escherichia coli*

EtBr – brometo de etídio

F – forward

FAO – Food and Agricultural Organization

FDI – factor de diluição

Flo<sub>H<sub>2</sub>O</sub> – amostra controlo

Flo<sub>Vi</sub> – amostra infectada com o fungo *Venturia inaequalis*

G – guanina

GA<sub>3</sub> – ácido giberélico

Sofia Araújo

Gala<sub>H<sub>2</sub>O</sub> – amostra controlo

Gala<sub>vi</sub> – amostra infectada com o fungo *Venturia inaequalis*

GPP – Gabinete de Políticas e Projectos

h – hora

HR – resposta de hipersensibilidade

IPTG – isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopironósido

K – potássio

LB – Luria-Bertani

LB<sub>comp</sub> – Meio Luria-Bertani para bactérias competentes

LRR – Leucine-Rich Repeats

min – minutos

N – azoto

NaClO – hipoclorito de sódio

nt – nucleótidos

OD – densidade óptica

P – fósforo

pb – pares de bases

PCR – polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)

PCS – fitoquelatina sintase

PGIP – polygalacturonase-inhibiting protein (protein de inibição da poligalacturonase)

p/v – peso/volume

R – reverse

RACE – Rapid Amplification of cDNA ends

RNA – Ribonucleic Acid (Ácido ribonucleico)

RNase – ribonuclease

rpm – rotações por minuto

RT-PCR – reverse-transcription PCR (transcrição reversa PCR)

RT-qPCR – transcrição reversa seguida de PCR em tempo real

s – segundos

TAE – tris-acetato-EDTA

Ta – temperatura de emparelhamento

Taq – *Thermus aquaticus*

T – timina

Tm – temperatura de desnaturação

Tris – tris(hidroximetil)aminometano

U – unidade

V – volts

Vi – *Venturia inaequalis*

X-Gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil  $\beta$ -D-galactopiranósido



## 1 – Introdução

A cultura da maçã é uma cultura de extrema importância, tanto a nível nacional como global. É cultivada em quase todos os países do mundo, sendo a segunda cultura com maior representatividade no sector da fruticultura a nível mundial, somente ultrapassada pela cultura da banana. Em Portugal é a cultura com maior expressão, quer seja quanto à produção quer quanto à área, contendo a região do Oeste a maior proporção das duas variáveis anteriormente mencionadas.

Por ter tanta importância na economia é necessário arranjar soluções para os problemas que a podem afectar (pragas, doenças, acidentes fisiológicos, entre outros), o que tem passado pela aplicação de produtos químicos, envolvendo entre 15-20 tratamentos por ano (MacHardy, 1996; Brogini *et al.*, 2011). Apesar de o uso dos químicos ser rápido e eficaz no tratamento contra os inimigos das culturas, há, hoje em dia por parte dos produtores, uma maior consciencialização do resultado das excessivas utilizações dos agroquímicos, quer para o Homem quer para o Ambiente. A par da pressão dos consumidores de quererem comprar produtos isentos de resíduos.

O pedrado (agente causal *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint.) é uma doença chave na cultura da maçã, que requer uma série de tratamentos ao longo da campanha, tornando por isso essencial encontrar alternativas ao uso de químicos. Entre estas alternativas encontra-se a luta genética, que tem como objectivo a “criação de variedades com características de resistência aos inimigos das culturas, descobertas e/ou desenvolvidas pelo Homem” (Amaro, 2003) e a indução de mecanismos de protecção endógena (activação de vias de defesa). Estas abordagens implicam o estudo da interacção entre o fungo e a planta, para tentar identificar os genes que na planta respondem à penetração do fungo (genes de resistência – R) e os vários mecanismos moleculares que ocorrem no início do processo de defesa.

O trabalho que de seguida se apresenta teve como objectivo contribuir para este estudo, analisando por RT-qPCR (transcrição reversa seguida de PCR em tempo real) o padrão de expressão de alguns genes relacionados com o metabolismo da parede celular e de genes relacionados com respostas a stresses, entre outros, durante a interacção estabelecida após inoculação de jovens plantas de macieira com *V. inaequalis*.

## 2 – Revisão bibliográfica sobre a interacção entre *Venturia inaequalis* e a macieira

A doença do pedrado da macieira e a biologia do seu agente causal encontram-se amplamente estudados (Boone, 1971; Chevalier *et al.*, 1991; Gessler, 1992; MacHardy, 1996; Bus *et al.*, 2011). Esta revisão mencionará apenas algumas características importantes da macieira e do fungo causador da doença, de forma a contextualizar o trabalho realizado, focando-se nos aspectos já conhecidos da interacção entre os dois.

### 2.1 – O hospedeiro (*Malus x domestica* Borkh.)

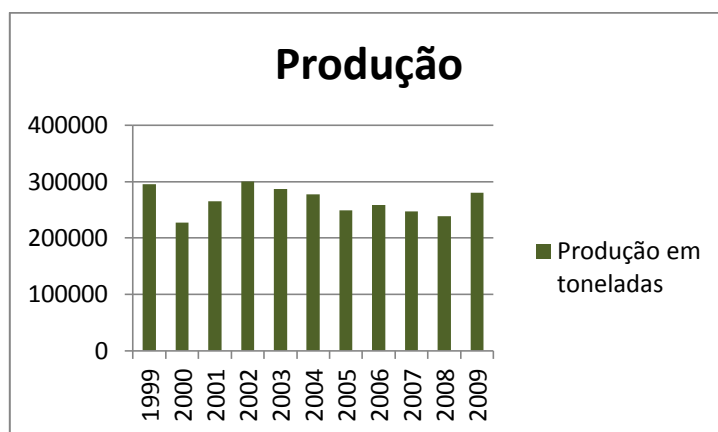
#### 2.1.1 – Importância da macieira no Mundo e em Portugal

##### 2.1.1.1 – Produção mundial

Os últimos dados da FAO revelam que a cultura da maçã, no sector da fruticultura, é das culturas com maior expressão no Mundo, somente ultrapassada pela cultura da banana. Em 2009 a produção mundial foi de 71 736 938 toneladas, numa área de colheita de 4 957 192 ha. A macieira é cultivada na maioria dos países e o maior produtor é a República Popular da China, com um volume de produção de 31 204 163 toneladas, numa área de 2 015 466 ha, representando 43 % da produção mundial (FAO, 2011).

##### 2.1.1.2 – Produção nacional

O sector frutícola tem muita importância na agricultura portuguesa e são as espécies de pomóideas (macieiras e pereiras, principalmente) as culturas de maior expressão. Segundo os dados da FAO de 2009 (último ano disponível), a maçã é a cultura com maior peso na produção de frutos para consumo em fresco (280 078 toneladas), numa área de produção de 20 625 ha. Pode verificar-se que a produção, apesar de ligeiras variações, manteve-se sempre acima das 200 000 t no período 1999-2009 (Figura 1).



**Figura 1:** Evolução da produção de maçãs em Portugal (1999-2009) (FAO,2011).

### 2.1.2. – Principais cultivares

As cultivares de maior expressão em Portugal são: ‘Golden Delicious’, ‘Royal Gala’, ‘Red Delicious’/‘Starking’, ‘Jonagold’, e ‘Jonagored’, ‘Reineta’ (Parda e Branca) e ‘Bravo de Esmolfe’ (GPP, 2007). Quase todas as variedades comerciais são susceptíveis ao pedrado (Soriano *et al.*, 2009; Cova *et al.*, 2010)., em menor ou maior grau. Esta doença, causada pelo fungo *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint., e a praga do bichado (*Cydia pomonella* L.) são os problemas fitossanitários mais prejudiciais nos pomares de macieiras portuguesas, causando, por vezes, prejuízos avultados se não forem tratadas devidamente.

### 2.2 – O parasita (*V. inaequalis* (Cke.) Wint.) causador da doença do pedrado da macieira

O pedrado, doença causada pelo fungo ascomiceta *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. (anamorfo *Spilocaea pomi* Fr.), é uma das doenças mais importantes da cultura da macieira (MacHardy, 1996) e está registada em todas regiões do Mundo que a produzem (MacHardy, 1996; Galli *et al.*, 2010a).

Não se sabe quando é que o pedrado passou a ser uma doença comum e séria e tão pouco se sabe se este fungo contribuiu para a selecção de cultivares em linhas iniciais, mas o primeiro relato data de 1819, na Suécia, mais ou menos 15 anos antes de ter sido registado na Alemanha (MacHardy, 1996).

Este fungo ataca apenas espécies do género *Malus* (MacHardy, 1996). O patogénio é um parasita altamente sofisticado que, ao manter uma relação compatível com o hospedeiro durante vários dias, estabelece o estroma e esporula (MacHardy, 1996). Os ascósporos compõem o inóculo primário na Primavera e a sucessiva produção de conídios promove o inóculo secundário nos diferentes órgãos, sendo mais susceptíveis as folhas jovens, flores, frutos e raminhos jovens. O fungo sobrevive ao Inverno – período de repouso ou latência em que a actividade vegetativa da árvore é inexistente e se dá a queda das folhas (Agustí, 2004) – na forma de pseudoteca em folhas mortas infectadas com pedrado que se encontram no solo, e também como estroma em pústulas no ritidoma da madeira. Estes dois órgãos são as principais fontes do inóculo primário (infecção das folhas), reiniciando-se o ciclo. Os primeiros órgãos verdes a estarem expostos no início do ciclo vegetativo (Primavera) são as sépalas, que podem ser infectadas numa fase muito inicial do ciclo; estas podem ser a fonte do inóculo secundário, pois acompanham o crescimento do fruto até este ficar maduro, podendo infectá-lo (Keitt & Jones, 1926, Kennel & Moosherr, 1983, Kennel, 1987, Kennel, 1989 e Becker *et al.*, 1992 *cit. in* MacHardy, 1996).

## **2.3 – Interação *Venturia inaequalis*-macieira**

### **2.3.1 – Aspectos histológicos da interação em hospedeiros resistentes e hospedeiros susceptíveis**

Verifica-se que diferentes genótipos de macieira apresentam diferentes sensibilidades ao fungo, variando a resposta desde grande susceptibilidade até resistência. Vários estudos histológicos já revelaram que tanto nas cultivares resistentes como nas susceptíveis há penetração do fungo através da cutícula e desenvolvimento no espaço subcuticular, de onde este consegue retirar os nutrientes necessários sem penetrar nas células do tecido hospedeiro (Chevalier *et al.*, 1991), sendo nesta fase que se manifesta o comportamento de susceptibilidade ou resistência, por parte do hospedeiro (Mota & Oliveira, 2008). Uma breve descrição do comportamento dos dois tipos de hospedeiro será de seguida apresentada.

Nos hospedeiros susceptíveis dá-se uma degradação da parede celular nos locais em que o fungo está em contacto com as células hospedeiras, o fungo desenvolve-se e ocupa o espaço subcuticular. Numa fase inicial não se observam alterações histológicas nas células do hospedeiro, no entanto, após alguns dias são produzidos pelo fungo conidióforos na camada superior, que dão origem a conídios, surgindo aqui as lesões de aspecto aveludado. O citoplasma das células sofre uma depleção logo abaixo das lesões esporulantes, podendo ocorrer a morte da célula. Outros efeitos vão também ocorrer em simultâneo com o anteriormente referido, tais como: depleção de plastídeos, vacuolização das células do mesófilo e podendo ainda ocorrer necroses dos tecidos com o avançar da doença (Chevalier *et al.*, 1991).

Quanto aos hospedeiros resistentes, ocorre um desenvolvimento micelial no espaço subcuticular, que é muito menor quando comparado com o desenvolvimento nos hospedeiros susceptíveis, mas não se observa a degradação da parede celular do hospedeiro. Nas paredes celulares em redor do local de penetração do fungo há deposição de substâncias e as células periféricas colapsam num tempo curto, geralmente entre 20 e 72 h. Há uma interrupção do processo infeccioso devido à morte dos tecidos que rodeiam o fungo, ficando este limitado àquele espaço, acabando por morrer (Chevalier *et al.*, 1991). Esta diferença de comportamento deu origem a uma escala de severidade. Hough *et al.* (1953), definiram 5 classes de sintomas: classe 1 (sintomas pin-point), classe 2 (lesões cloróticas sem esporulação), classe 3 (poucas lesões restritas esporuladas), classe M (intermédia entre a classe 2 a classe 3) e classe 4 (esporulação abundante); estas classes foram definidas através de observações macroscópicas. Chevalier *et al.* (1991) estudaram as lesões em folhas de macieira infectadas por pedrado, ao nível microscópico, e estabeleceram uma outra escala de severidade, que de seguida se descreve:

Classe 1: depressão (100-500 µm de diâmetro), com as células da epiderme colapsadas e com paredes salientes. No centro da depressão permanece um conídio, que dá origem a um micélio estromático que fica restrito à zona subcuticular, de aparência densa ou reticulada. Nas áreas que se mantêm saudáveis, vários conídios germinam, formando um ou vários apressórios, não produzindo, no entanto estroma subcuticular. As células da parede da epiderme não sofrem alterações.

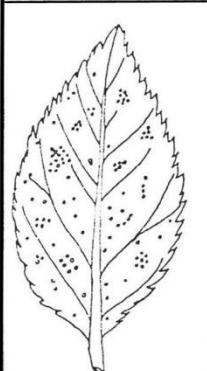
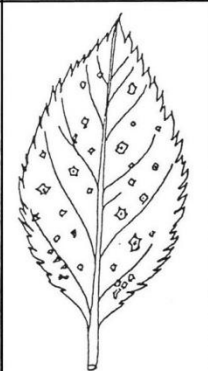


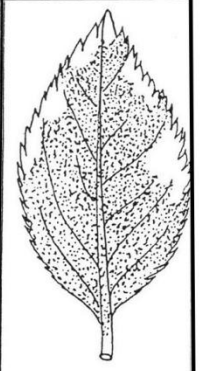
Classe 2: nesta segunda classe, vários conídios germinam, mas só alguns produzem estroma primário. Quando diferenciados, podem dar origem a hifas curtas e ramificadas ou a numerosas hifas que formam uma grande rede. O estroma secundário mantém-se reduzido. Quando os conidióforos se diferenciam, rapidamente abortam; não há produção de conídios. As células da parede da epiderme mostram-se achatadas.

Classe 3a: o fungo pode estar limitado a hifas radiais; os conidióforos abortam sempre. Normalmente o estroma secundário torna-se extensivo, faltando conidióforos. Quando se diferenciam, ou abortam ou dão origem a pequeno número de conídios de aspecto normal. As células da parede da epiderme colapsam em várias zonas.

Classe 3b (reação de susceptibilidade ligeira): a lesão caracteriza-se por apresentar uma densa rede micelial de espessura irregular, com ramificações abundantes. A conidiogênese é profusa, mas geralmente encontram-se numerosos conidióforos abortados misturados com conidióforos esporulados. A superfície das paredes da epiderme colapsam quando as lesões são necróticas.

Classe 4 (reação de susceptibilidade clara): muito similar à classe 3b. O estroma micelial forma uma rede subcuticular muito densa, de grande diâmetro. Esta classe caracteriza-se pela ausência de modificações histológicas nos diferentes tecidos da planta. Na página superior o estroma consiste em camadas de pequenas hifas (2 a 5 camadas), sem organização aparente, os numerosos conidióforos encontram-se agrupados e com esporulação abundante. Na página inferior o estroma organiza-se só numa camada e não ocorre muita esporulação.

Chevalier *et al.* (1991) associaram a cada classe uma resposta por parte da planta, representando-as na seguinte figura (Figura 2), sendo que a classe 1 corresponde a uma resposta de hipersensibilidade.

Class 1	Class 2	Class 3a	Class 3b	Class 4
				
Hypersensitivity	Resistance	Weak resistance	Weak susceptibility	Susceptibility

**Figura 2:** Classificação da severidade da doença de Chevalier *et al.* (1991).

## 2.3.2– Resistência do hospedeiro e virulência do parasita

### 2.3.2.1 – Resistência ao pedrado dentro do género *Malus*

Por ser uma espécie economicamente importante a nível mundial e sabendo que o fungo *Venturia inaequalis* é causador de uma doença que surge em todas as regiões produtoras do Mundo (Cova *et al.*, 2010; Galli *et al.*, 2010a), foi importante designar o tema da resistência ao pedrado como indispensável nos programas de melhoramento de macieiras (Galli *et al.*, 2010a). Apesar de, no início das investigações, nos séculos XVIII/XIX, encontrar resistências à doença não ser o principal objectivo dos investigadores, no final do século XIX, estes começaram a consciencializar-se de que era possível criar variedades resistentes ao pedrado (Williams & Kuc, 1969).

Várias espécies pertencentes ao género *Malus* são susceptíveis ao pedrado e a espécie mais atacada é *Malus x domestica* Borkh. As macieiras cultivadas para fins comerciais são muito susceptíveis (Soriano *et al.*, 2009; Cova *et al.*, 2010).

Foram encontradas, por Hough *et al.* (1953), seis selecções asiáticas de *Malus* que produzem pequenos frutos e que exibem resistência ao pedrado no campo. Estas são: *Malus atrosanguinea* 804, *Malus prunifolia* 19651, *Malus ringo*, *Malus toringo*, *Malus zumi* e *Malus floribunda* 821. Os investigadores consideravam que a resistência de *M. floribunda* 821 era controlada por um gene qualitativo isolado (*Vf*) ou por um conjunto de genes proximamente ligados (Williams & Kuc, 1969). No entanto foram já identificados e mapeados 16 importantes genes de resistência ao pedrado em várias espécies de macieiras (Soriano *et al.*, 2009), destacando-se os genes *Vf* (*Malus floribunda* 821), *Vb*, *Vr*, *Va*, *Vm*, *Vbj*, *Vx*, *Vr<sub>2</sub>*, já identificados em espécies selvagens de *Malus* (MacHardy, 1996; Patocchi *et al.*,

2004; Hemmat *et al.*, 2002 *cit. in* Degenhardt *et al.*, 2005) e também os genes *Vg*, encontrado em 'Golden Delicious', e *Vd<sub>3</sub>*, identificado e mapeado por Soriano *et al.* (2009).

Até agora, os programas de melhoramento genético com mais sucesso para cultivares resistentes ao pedrado usaram o principal gene de resistência *Vf*, que deriva da espécie *Malus floribunda* 821 (Janick *et al.*, 1996 *cit. in* Galli *et al.*, 2010a).

A clonagem e consequente sequenciação da região com o gene *Vf* revelaram que o *locus* resistente é composto por um conjunto de genes (*HcrVf1*, *HcrVf2*, *HcrVf3* e *HcrVf4*) (Vinatzer *et al.*, 2001; Xu & Korban, 2002; Tartarini *et al.*, 1999 e Patocchi *et al.*, 1999a, *cit. in* Degenhardt *et al.*, 2005; Paris *et al.*, 2009) que codificam proteínas semelhantes a receptores (RLP) (Boudichevskaia *et al.*, 2009a). Vinatzer *et al.* (2001) provaram que este conjunto de genes tem homologia com o conjunto de genes presentes no tomateiro, resistentes ao fungo *Cladosporium fulvum* (gene denominado *Cf*). A comparação das sequências de aminoácidos dos genes *HcrVf* com os genes *Cf* do tomateiro revelou a presença de domínios LRR (*leucine-rich repeats*) extra-citoplasmáticos (Vinatzer *et al.*, 2001).

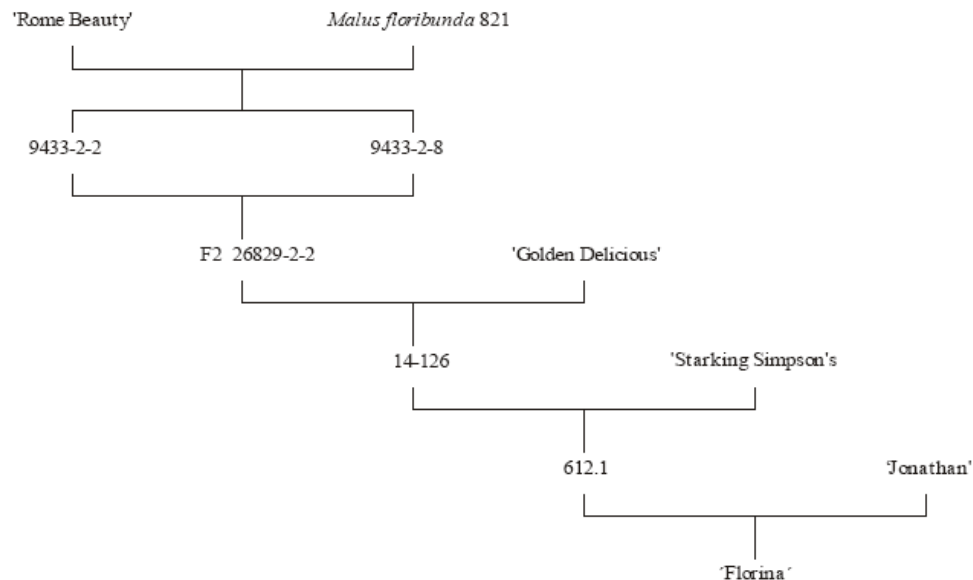
A transformação de macieiras com um dos genes presente no cluster (*HcrVf2*) provou ser suficiente para conferir resistência a *V. inaequalis* (Belfanti *et al.*, 2004 *cit. in* Degenhardt *et al.*, 2005; Paris *et al.*, 2009). No entanto, surgiram nos últimos anos duas novas raças do fungo (raças 6 e 7) que revelaram poder ultrapassar a resistência presente em plantas contendo o gene de resistência *Vf*, evidenciando que a resistência não é duradoura (Parisi *et al.*, 1993; Bénaouf & Parisi, 2000). Recentemente, foi descoberto por Soriano *et al.* (2009) um novo gene de resistência denominado *Vd3*. Este novo gene é resistente à cadeia virulenta EU-NL-24 que pertence à raça 7 do agente causal da doença (Soriano *et al.*, 2009).

Dentro dos genótipos resistentes que contêm o gene *Vf*, a cultivar mais divulgada é a 'Florina'.

A cultivar 'Florina' é uma cultivar que tem mostrado resistência ao pedrado. Esta cultivar foi obtida em França em 1977 e tem sido muito utilizada em estudos de resistência. É uma cultivar descendente da espécie *Malus floribunda* 821 que lhe deu o gene de resistência *Vf* e da cultivar 'Golden Delicious', que lhe transmitiu o gene de resistência *Vg* (Bénaouf & Parisi, 1997) (Figura 3), sendo por isso uma boa candidata a esclarecer a interacção, ao nível molecular, entre o fungo e o hospedeiro resistente.

Esta cultivar não apresenta uma resposta de hipersensibilidade (HR) clara (Komjanc *et al.*, 1999 *cit. in* Mota, 2002), estando a sua resistência associada à classe 0-2 (ou 1 a 3a

(Chevalier *et al.*, 1991)), variando entre não ter sintomas a evidências de lesões cloróticas ou necróticas sem esporulação (Ivanicka *et al.*, 1996).



**Figura 3:** Obtenção da cultivar resistente 'Florina' (Sansavini, 1993 *in* Mota, 2002).

### 2.3.2.2 – Níveis de virulência do fungo *Venturia inaequalis*

Dentro da espécie *Venturia inaequalis* existem diversas raças. Foram descritas, até agora, sete raças, com base na virulência diferencial que mostravam em cada hospedeiro (Shay & Williams, 1956); algumas destas raças infectam e ultrapassam alguns dos genes de resistência. Alguns investigadores observaram que as 6 e 7 raças são responsáveis por diferentes graus de incidência e severidade da doença, nos diferentes genótipos (Shay & Williams, 1956; Williams & Kuc, 1969, Benaouf & Parisi, 2000).

A raça mais comum, e que tem distribuição mundial, é a raça 1, ataca *Malus x domestica*. A raça 2, isolada nos EUA, ataca sucessivamente *Malus baccata* 'Dolgo', 'Alexis' e 'Bittercrab' e alguns segregados das plântulas russas R12740-7A, mas não o gene *Vr*. A raça 3, encontrada na Nova Escócia, Canadá, ultrapassa a resistência que existe na variedade 'Geneva'. A raça 4 encontrada no Indiana, EUA, ataca alguns segregados das plântulas russas R12740-7A (Crosby *et al.*, 1992), sugerindo um terceiro *locus* para a resistência qualitativa diferente do que supera a raça 2 ou o gene *Vr*. A raça 5 que supera o gene *Vm* (resistência do tipo *pit*), encontrado nas espécies *Malus micromalus* e *Malus atrosanguinea* (Williams & Kuc, 1969; Parisi *et al.*, 1993), foi colhida no Instituto John Innes, Reino Unido (Williams & Brown, 1968 *cit. in* Mota, 2002). A raça 6 ultrapassa a introgressão de resistência *Vf*, esta não ataca variedades susceptíveis, tais como 'Granny Smith', 'Reinette Clochard' ou *Malus baccata jackii*, *Malus pumila* R12740-7A ou 'Antonovka' PI 172623. A última raça a ser isolada, raça 7, provou ser capaz de ultrapassar a resistência presente em



*Malus floribunda* 821 (gene Vf) (Roberts & Crute, 1994) e já foi encontrada em vários locais da Europa (Parisi, 1997 *cit. in* Benaouf & Parisi, 2000).

Recentemente foi demonstrado que todas as cultivares de macieira têm genes de resistência contra todos os genótipos de *V. inaequalis*, excepto aqueles que não têm os alelos de avirulência correspondentes. No entanto, na Natureza, o inóculo de pedrado é sempre uma mistura de genótipos virulentos e avirulentos. Consequentemente não se observam estas resistências no campo e por essa razão são denominadas efêmeras (Koch *et al.*, 2000 *cit. in* Mota, 2002).

### 2.3.3 – Interação macieira–pedrado no contexto da teoria gene-a-gene

Como apresentado no ponto anterior, alguns genes de avirulência foram identificados no parasita em estreita relação com os genes de resistência do hospedeiro e algumas raças fisiológicas de *Venturia inaequalis* foram definidas com base na sua patogenicidade específica para com diferentes genótipos do hospedeiro, apresentando estas resistência diferencial (Shay & Williams, 1956; Williams & Kuc; 1969; Crosby *et al.*, 1992). Neste contexto, a interação *V. inaequalis*-macieira é considerada um exemplo na interação gene-a-gene (MacHardy, 1996; Mota, 2002; Cova *et al.*, 2010; Bus *et al.*, 2011).

A teoria gene-a-gene foi proposta para explicar, de uma maneira simples, os resultados dos estudos da hereditariedade da patogenicidade do fungo *Melampsora lini* (Ehrenb.) Lév. que provoca a ferrugem na planta *Linum usitatissimum* L. (linho) (Flor, 1971). Esta teoria afirma que “para cada gene que confere virulência ao patógeno, existe correspondência a um outro que confere resistência ao hospedeiro” (Flor, 1971). Segundo esta teoria, nos organismos vegetais existem genes de resistência, que são geralmente dominantes (R), sendo os de susceptibilidade recessivos (r) e nos agentes patogénicos existem genes de avirulência (tida como incapacidade para infectar) dominantes (Avr), sendo os de virulência recessivos (avr). A maior parte dos genes de resistência (R) possui regiões LRR (*leucine-rich repeat*) (Xu & Korban, 2004), o que sugere que estas regiões estão envolvidas no reconhecimento dos ligandos segregados pelo patógeno e que estão em evolução adaptativa (Michelmores & Meyers, 1998 *cit. in* Xu & Korban, 2004). A maioria destes genes está organizada em complexas famílias de genes agrupados em determinadas regiões do cromossoma (Wise, 2000 *cit. in* Xu & Korban, 2002).

A ausência de genes de avirulência (ausência de genes Avr) no patógeno vai permitir a invasão no hospedeiro, mesmo que se verifique o gene de resistência na planta, como se pode analisar na Quadro 1. Só ocorrerá uma resposta de resistência quando o patógeno produzir um produto de genes que eliciem na planta uma resposta aquando da presença de um gene específico de resistência (Beynon, 1997).

**Quadro 1:** A premissa básica da hipótese gene-a-gene (Teoria de Flor) (Beynon, 1997)

Planta hospedeira	Patogénio	
	Gene de avirulência presente	Gene de avirulência ausente
<b>Gene de resistência presente</b>	Interação que leva à resistência – <b>Incompatibilidade</b>	Não há interação, é permitido o crescimento do fungo – <b>Compatibilidade</b>
<b>Gene de resistência ausente</b>	Não há interação, é permitido o crescimento do fungo – <b>Compatibilidade</b>	Não há interação, é permitido o crescimento do fungo - <b>Compatibilidade</b>

Esta teoria assume que ao longo dos anos as plantas e os agentes patogénicos foram evoluindo convergentemente, isto é, assume que as plantas, ao interagirem constantemente com uma enorme variedade de patogénios desenvolveram estratégias de reconhecimento desses mesmos patogénios, activando mecanismos de defesa (Cova *et al.*, 2010; Galli *et al.*, 2010b) o que leva a que alterações na virulência de um patogénio possam surgir em resposta a alterações na resistência do hospedeiro, sendo que o contrário também se pode verificar (Galli *et al.*, 2010b).

Apesar da multiplicidade de reacções de resistência induzida, está postulado que os mecanismos de defesa das plantas partilham algumas características: 1) reconhecimento do patogénio por parte da planta como não sendo seu; 2) percepção de um sinal que provém do patogénio; 3) transdução de sinais intracelulares; 4) início de respostas de defesa (Ebel & Scheel, 1992).

É provável que os genes de avirulência codifiquem moléculas eliciadores específicas de determinadas raças, que interagem com receptores vegetais codificados por genes de resistência (Gabriel & Rolf, 1990 e Keen, 1990 *cit. in* Knogge & Marie, 1997). Se o reconhecimento por parte da planta se der numa fase inicial, resulta, em muitos casos, na morte rápida de algumas células, nos locais infectados (resposta de hipersensibilidade, HR) e também na activação ou na indução de muitas reacções de defesa (Kombrink & Somssich, 1995 *cit. in* Knogge & Marie, 1997). Stakman, em 1915, ao estudar a resistência a *P. graminis*, utilizou pela primeira vez o termo hipersensibilidade para descrever "...a morte rápida e anormal das células vegetais do hospedeiro quando atacadas por hifas de ferrugem", a partir desta afirmação foi possível constatar que para cada gene de resistência há, por parte da planta, um determinado tipo de resposta (Mansfield *et al.*, 1997). Uma única planta pode produzir variadas respostas quando atacada por diferentes raças do mesmo patogénio (Beynon, 1997).

Foi provado, em investigações iniciais, que a resistência varietal pode expressar-se em diferentes estádios da interacção entre a planta e o patógeno e que a variação fenotípica reflecte a presença de diferentes genes de resistência na planta hospedeira (Mansfield *et al.*, 1997). As diferentes gradações de resistência ao pedrado podem ser observadas também ao nível histológico, variando o comportamento entre as classes 1 e 3a, propostas por Chevalier *et al.* (1991), sendo que a classe 1 caracteriza-se por ser do tipo resposta de hipersensibilidade e a 3a por ser de fraca resistência; estas diferenças devem-se ao(s) gene(s) de resistência encontrado(s) na planta e também ao gene de virulência do fungo.

Uma das respostas detectadas numa interacção incompatível é a produção de uma explosão de um superóxido, possivelmente envolvendo NADPH oxidase (Lamb, 1994 *cit. in* Beynon, 1997). Provavelmente, a detecção do sinal de avirulência pelo gene de resistência resulta na indução de um sinal que activa uma via de transdução, resultando assim numa explosão oxidativa. Como consequência, as paredes celulares fortificam-se, ocorre a descompartimentação celular e as fitoalexinas e as proteínas relacionadas com a patogénese (e.g. quitinase e glucanase) são produzidas nas células vizinhas (Beynon, 1997). A resposta de defesa da planta é também observável ao nível histológico, pois quando o hospedeiro é penetrado pelo fungo vão ocorrendo mudanças visíveis nas células da epiderme, denominadas sintomas e que dependem da interacção parasita-hospedeiro estabelecida, que fazem com que se possa distinguir hospedeiros susceptíveis de hospedeiros resistentes.

Para Beynon (1997), não é necessariamente verdadeiro que um gene de resistência reconheça somente um sinal do gene de avirulência, também não há razão para que um gene de avirulência seja detectado exclusivamente por um gene de resistência. Esta afirmação foi sugerida devido a uma mutação verificada num gene de resistência da espécie *Arabidopsis thaliana*, que é capaz de reconhecer mais do que uma molécula sinal. E também porque existem genes na ervilheira, no feijoeiro e na soja que são homólogos funcionais ao gene de resistência presente na *Arabidopsis* (Dangl *et al.*, 1992 *cit. in* Beynon, 1997), sugerindo que alguns genes nestas plantas, que nada têm que ver com *Arabidopsis*, desenvolveram a capacidade de detectar o mesmo sinal do gene de avirulência.

#### **2.3.3.1 – Abordagens moleculares para estudo da interacção parasita-hospedeiro – estudos já realizados**

A análise molecular dos processos que ocorrem durante a interacção entre o fungo e o hospedeiro resistente pode contribuir para identificar vias metabólicas activadas durante o mecanismo de defesa e hipotéticos genes de resistência (Degenhardt *et al.*, 2005; Mota & Oliveira, 2008). Em estudos anteriormente realizados (Mota, 2002) verificou-se que há activação dos genes que codificam PGIPs (proteína de inibição de poligalactorunase) no

início do processo de interacção em resposta à inoculação com *Venturia inaequalis*. A sobre-regulação destes genes integra-se na resposta por parte do hospedeiro, funcionando como indicador da resistência dessa resposta, e a sua função é inibir a actividade das endopoligalactorunases que são os primeiros enzimas segregados por fungos fitopatogénicos a serem detectados pelas plantas (Jones *et al.*, 1972 *cit. in*. Mota, 2002) e que têm como função destruir a parede celular. Está descrito que a endopoligalactorunase produzido por *V. inaequalis* participa no início do desenvolvimento micelial (Kollar, 1998 *cit. in* Mota, 2002). Os PGIPs são proteínas LRR extracelulares que se ligam às endopoligalactorunases e por consequência inibem a sua acção (Nuss *et al.*, 1996 *cit. in* Mota, 2002).

#### **2.3.3.1.1 – Hibridação Subtractiva**

A utilização da técnica de hibridação subtractiva (*SSH – suppression subtractive hybridization*), que possibilita a clonagem de sequências expressas (EST's), representantes de genes diferencialmente expressos em diferentes populações de mRNA, permitiu analisar, por Degenhardt *et al.* (2005) duas cultivares, a 'Remo' (cultivar resistente) e a 'Elstar' (cultivar susceptível). O grupo estudou alguns genes de defesa nestas duas cultivares (não infectadas e infectadas) e obteve como resultado que os genes que codificam proteínas presentes na defesa da planta são constitutivamente expressos a níveis mais altos na cultivar resistente. Foi também descoberto que após inoculação com uma suspensão conidial de *V. inaequalis*, os produtos transcritos sofrem uma sobre-regulação, na cultivar susceptível ('Elstar').

#### **2.3.3.1.2 – “Differential display” RT-PCR**

Uma outra técnica de biologia molecular utilizada para analisar a interacção entre a macieira e o fungo foi a técnica de “*Differential display*” RT-PCR com o objectivo de estudar a interacção entre 'Florina' e *V. inaequalis* (Mota, 2002; Mota & Oliveira, 2008). Através desta técnica foram identificados vários genes como participantes na interacção, passando-se de seguida a uma breve apresentação dos mesmos.

### **2.4 – Fragmentos envolvidos na interacção já identificados e sua hipotética função**

Nos trabalhos efectuados por Mota (2002) e Mota & Oliveira (2008), foram realizados ensaios com diversos iniciadores, dos quais resultaram vários fragmentos que revelaram ser regulados em resposta à interacção com o fungo *V. inaequalis*. O software BLAST sugere homologias significativas para alguns dos fragmentos encontrados. Mota chegou à conclusão que alguns desses fragmentos tinham homologia forte com genes pertencentes a outras plantas, nomeadamente com genes de resistência, genes que se expressam em alturas de *stress* biótico ou abiótico, genes relacionados com a síntese da parede celular,

como observado no Quadro 2. Nos estudos realizados, a hipótese de alguns desses fragmentos pertencerem ao genoma do fungo foi afastada, pois foi verificado que as homologias apontavam para que os fragmentos analisados pertencessem a tecidos do hospedeiro, na medida em que apresentavam maior semelhança com sequências de espécies de plantas (Mota & Oliveira, 2008).

**Quadro 2:** Genes já referenciados na interação *V. inaequalis*-macieira

Fragmentos identificados por DDRT-PCR	Homologia com genes que codificam:	Função
M9	Celulose sintase	Genes relacionados com a parede celular
M10	CUT (very-long-chain fatty acid condensing enzyme CUT1)	
M3	Glutatio S-transferase	Genes de resposta a stresses
N54	Fitoquelatina sintase	
N3021	Citocromo c oxidase	
N910	Família de proteínas “Rhomboid”	Genes com função não totalmente conhecida nas plantas
M6	$Vr_2$	Gene de resistência
M13		Gene sem função conhecida

## 2.4.1 – Genes relacionados com a parede celular

### 2.4.1.1 – Celulose sintase (M9)

A parede celular é uma matriz extra-citoplasmática de polissacáridos e proteínas que circunda as células vegetais e que se pode modificar durante o desenvolvimento ou quando se dá um ataque por parte de um patógeno (Caño-Delgado *et al.*, 2003).

Após as primeiras observações de que a parede celular contém proteínas (Lamport & Northcote, 1960 *cit. in* Dumas *et al.*, 2008), surgiu o conceito de que a parede celular pode ser uma estrutura dinâmica que está envolvida nos processos de sinalização e defesa (Zwiegelhaar & Dubery, 2006; Dumas *et al.*, 2008), aspecto ilustrado pela capacidade dos oligossacáridos derivados de pectinas induzirem respostas de defesa (Darvill & Albersheim, 1984 *cit. in* Dumas *et al.*, 2008).

Têm sido feitos muitos esforços no sentido de encontrar os genes que codificam estes mecanismos de defesa (Zwiegelhaar & Dubery, 2006). A descoberta de que as “cellulose-binding domains” (CBDs) pertencentes à “cellulose-binding elicitor lectin” (CBEL), indutora

do fungo *Phytophthora parasítica* Dastur, são suficientes para induzir os mecanismos de defesa nas plantas, suportou a possibilidade de a celulose poder fazer parte dos mecanismos de defesa (Gaulin *et al.*, 2006 *cit. in* Dumas *et al.*, 2008).

A lenhina é sintetizada durante o desenvolvimento normal das plantas para reforçar as paredes celulares (Caño-Delgado *et al.*, 2003), tendo como função conferir rigidez (força mecânica) e impermeabilidade (condução da água). Juntamente com outros compostos fenólicos, é também sintetizada em resposta à entrada de patógenos para inibir o seu crescimento e em resposta a outros *stresses* (revisto por Vance *et al.*, 1980 *cit. in* Caño-Delgado *et al.*, 2003). Caño-Delgado *et al.* (2003) demonstraram uma ligação directa entre a celulose sintetase e a lenhina, ou seja, níveis baixos de síntese de lenhina estão relacionados com níveis baixos de celulose sintetase (Caño-Delgado *et al.*, 2003), podendo isto querer dizer que quando não há produção de celulose sintetase, mais facilmente poderão entrar, através da parede celular, os patógenos.

A pesquisa destes investigadores indicou que deve existir um mecanismo que é inerente às paredes celulares das plantas, que monitoriza a integridade das paredes, para responder à reduzida função das paredes celulares e que induz o reforço da lenhificação se as paredes estiverem fracas ou se forem alvo da presença de patógenos (Caño-Delgado *et al.*, 2003)

#### **2.4.1.2 – CUT1 (very-long-chain fatty acid condensing enzyme CUT1) (M10)**

O CUT1 é um gene que está presente na biossíntese da cera cuticular, encontrado por Millar *et al.* (1999), na planta *Arabidopsis thaliana*. As ceras são constituintes da cutícula (uma barreira hidrofóbica que tem função de barreira na parte aérea das plantas terrestres), e possuem várias funções físicas e químicas que são determinantes nas funções vitais das plantas, tais como regulação das perdas de água e protecção contra raios UV (Reicosky & Hanover, 1978 *cit. in* Millar *et al.*, 1999) e também ajudam na função de resistência à entrada de fungos e bactérias patogénicas (Jenks *et al.*, 1994 *cit. in* Millar *et al.*, 1999).

As ceras cuticulares são complexas misturas de lípidos e a sua composição é diferente de planta para planta, diferem até mesmo em diferentes órgãos da mesma planta (Post-Beittenmiller, 1996 *cit. in* Millar *et al.*, 1999).

#### **2.4.2 – Genes de resposta a stresses**

##### **2.4.2.1 - Glutatião S-transferase (GST) (M3)**

As proteínas glutatião S-transferase pertencem a uma família de proteínas que é codificada por uma família de genes divergente. Esta família é solúvel e abundante, sendo que as proteínas expressam-se numa grande variedade de respostas celulares, que vão desde

respostas a *stresses* abióticos (resposta à salinidade, Qi *et al.* (2010)) a bióticos (Mukherjee *et al.*, 2010), no qual se encontra a resposta à entrada de um parasita na planta.

Várias proteínas desta família foram já identificadas, uma delas foi encontrada em vários locais, incluindo cloroplastos, vacúolos e peroxissomas, sugerindo um possível envolvimento em respostas de defesa à infecção (Zybailov *et al.*, 1994 e Heazlewood *et al.*, 2004 *cit. in* Mukherjee *et al.*, 2010). É sabido que diferentes proteínas GST são sobrerreguladas em resposta a patógenos (bactérias e fungos) (Mukherjee *et al.*, 2010).

#### **2.4.2.2 – Fitoquelatina sintase (PCS) (N54)**

A acumulação de fitoquelatinas faz com que vários organismos sobrevivam na presença de concentrações tóxicas dos metais pesados cádmio (Cd) e arsénico (As) (Cobbett & Goldsbrough, 2002 *cit. in* Clemens & Persoh, 2009). Pensa-se assim que estas enzimas respondem a *stresses* abióticos provocados pelas altas concentrações destes dois elementos, catalizando a formação não ribossómica de peptídeos de ligação a metais (Clemens & Persoh, 2009). Estão também envolvidas no metabolismo do enxofre (Mota & Oliveira, 2008). Contudo, existem vários estudos que apontam para uma sobre-regulação de genes desta família, que dão resposta a “*stresses*” de origem biótica, designadamente a ataques de fungos como *Blumeria graminis* (DC.) Speer em cevada (Eckey, 2002 *cit. in* Mota & Oliveira, 2008) ou *Peronospora tabacina* Skalický na planta do tabaco (Lawrence *et al.*, 2001 *cit. in* Mota & Oliveira, 2008) ou bactérias do género *Pseudomonas* em soja (Kang *et al.*, 2003 *cit. in* Mota & Oliveira, 2008).

Existem fortes evidências de que as PCS exercem funções para além da desintoxicação do Cd e do As, e futuras pesquisas deverão ser efectuadas para entender melhor estas enzimas (Clemens & Persoh, 2009).

#### **2.4.2.3 – Citocromo oxidase (N3021)**

O Citocromo c oxidase (COX) é um complexo multimérico, composto por diversas subunidades (Curi *et al.*, 2005 *cit. in* Attallah *et al.*, 2007). Vários investigadores estudaram este complexo e chegaram à conclusão que as subunidades grandes (COXI, COXII e COXIII) são codificadas na mitocôndria e outras mais pequenas são codificadas no núcleo da célula (Kubo *et al.*, 2006; Attallah *et al.*, 2007).

Ainda não está completamente esclarecida a função deste complexo, mas é provável que esteja presente na resposta a *stresses* bióticos e abióticos (Attallah *et al.*, 2007).

### 2.4.3 – Genes com função não totalmente conhecida nas plantas

#### 2.4.3.1 – Família de proteínas “*Rhomboid*” (N910)

Os genes de família de proteínas “*Rhomboid*” foram inicialmente descobertos em *Drosophila* sp., estes genes codificam proteases de serina intramembranárias, que cortam os ligandos dos factores de recepção do crescimento da epiderme (EGFR) para libertar factores de crescimento activos (Kanoaka *et al.*, 2005). Estas proteínas estão presentes em actividades de comunicação intercelulares, actividades estas que são mecanismos fundamentais que coordenam o desenvolvimento de formas complexas, que caracterizam os organismos multicelulares (Kanoaka *et al.*, 2005).

As plantas também possuem proteínas “*Rhomboid*” (Brown *et al.*, 2000 *cit. in* Kanakoa *et al.*, 2005), mas a sua função não foi ainda caracterizada. Tal como em *Drosophila* sp. a proteína “*Rhomboid*” está localizada no Complexo de Golgi. Um dos genes pertencente à proteína “*Rhomboid*” e isolado por Kanakoa *et al.* (2005), mostrou actividade proteolítica e especificidade do substrato, sendo esta a primeira evidência de que a actividade proteolítica e a especificidade do substrato desta família está conservada nas plantas (Kanakoa *et al.*, 2005). Ficou então provado que algumas proteínas “*Rhomboid*” são importadas para a mitocôndria, onde estão presentes na fusão da membrana, mas a maior parte localiza-se no Complexo de Golgi e funcionam na via secretória, tal como a “*Rhomboid*” de *Drosophila* sp. (Kanakoa *et al.*, 2005).

#### 2.4.4 – Gene de resistência (M6) – *Vr<sub>2</sub>*

Mota (2002), encontrou uma sequência que apresentava semelhanças com um gene de resistência, encontrado em *Arabidopsis*. Mais recentemente, refazendo a análise BLAST para esta sequência, encontrou-se um gene homólogo denominado *Rvi15* (*Vr2*), encontrado por Patocchi *et al.* (2004). Este gene foi estudado por Galli *et al.* (2010a e 2010b); o grupo observou que as plantas inoculadas com uma suspensão conidial de *V. inaequalis* apresentam uma Resposta de Hipersensibilidade, confirmada pela chave de Chevalier *et al.* (1991). Este gene, apesar de ser de resistência, tem uma resposta mais lenta à infecção do que outros genes envolvidos na resposta de defesa (Galli *et al.*, 2010b).

#### 2.4.5 – Genes sem função conhecida (M13)

Uma sequência foi identificada por DDRT-PCR, por Mota (2002), mas não apresentou homologia com nenhuma outra da base de dados, pelo que a sua função é ainda desconhecida.



## **2.5 – Avaliação do padrão de expressão dos genes anteriormente identificados em resposta à inoculação com *Venturia inaequalis***

A regulação dos genes correspondentes a estes fragmentos num hospedeiro susceptível e num resistente em resposta à inoculação com *Venturia inaequalis* vai ser analisada por RT-qPCR (PCR em tempo real) neste trabalho. Nesta técnica, que tem como objectivo amplificar e quantificar fragmentos de cDNA ou DNA, a expressão é analisada na fase exponencial da reacção de amplificação. Esta abordagem tem sido utilizada para estudar diferentes interacções parasita-hospedeiro, tal como a verificada entre a planta modelo *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. e o fungo *Alternaria brassicicola* (Schwein.) Wiltshire., onde foram estudadas as mudanças ao nível dos produtos transcritos que ocorrem durante o mecanismo de resposta (Schenk *et al.*, 2003).

### 3 – Material e métodos

#### 3.1 – Inoculação artificial de macieiras

##### 3.1.1 – Obtenção do material vegetal

Os ensaios de inoculação artificial foram realizados com plantas jovens de macieira oriundas de sementes de frutos de 'Royal Gala'.

Para obter estas plantas, 100 sementes foram lavadas, duas vezes, com água durante 5 min. Logo de seguida foram submersas em etanol (70 %) durante 1 min. As sementes foram passadas por água esterilizada ( $\text{dH}_2\text{O}_{\text{PCR}}$ ) para remover o excesso de etanol. A lavagem seguinte foi efectuada com a solução NaClO (1 %), duas vezes e durante 5 min cada. O excesso de NaClO foi retirado através de três lavagens com água esterilizada, com a duração de 5 min cada. Das 100 sementes que se desinfectaram, 50 foram tratadas com ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ) com a concentração final de 0,01 % (foram deixadas 24 h no ácido para garantir a quebra de dormência). Após as 24 h, as sementes foram colocadas em caixas de Petri com algodão humedecido e papel de filtro esterilizados, devidamente identificadas, e colocadas a germinar no frigorífico durante três semanas. As outras 50 sementes foram também colocadas em caixas de Petri e preparadas da mesma forma, sendo depois colocadas a germinar no frio.

Ao fim das três semanas, as sementes já germinadas foram transplantadas para tabuleiros alveolados. Fez-se uma mistura de substrato de turfa Levington F2 (Fisons, UK) com perlite (proporção de 2:1) e colocou-se as sementes nos alvéolos, por cima da mistura e das sementes aplicou-se vermiculite de granulometria fina. Os tabuleiros alveolados foram colocados em tabuleiros propagadores, onde se adicionou água com adubo líquido (6-3-6 (N-P-K)) Os tabuleiros foram colocados numa câmara de crescimento com ambiente controlado a  $20 \pm 1$  °C, humidade relativa de 70 % e fotoperíodo de 20 h, fornecido por tubos fluorescentes Osram de luz fria branca a  $250 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , para o crescimento das plântulas. Quando estas atingiram cerca de 10 cm foram transplantadas para pequenos vasos de plástico rígido (aproximadamente  $650 \text{ cm}^3$ ), contendo a mesma mistura de substrato acima referida. Os vasos foram mantidos fora da câmara de crescimento, onde foram regados e adubados com a devida regularidade. As jovens plantas foram depois transplantadas para vasos de plástico de maior volume (aproximadamente  $1592 \text{ cm}^3$ ).

##### 3.1.2 – Inoculação do material vegetal

Para a inoculação das plantas, foram construídas duas pequenas estufas (Figura 4), uma para as plantas controlo (inoculadas com água) e outra para as plantas inoculadas com uma suspensão de conídios de *V. inaequalis*. Cada uma das estufas continha 8 plantas.



**Figura 4:** Estufins com vasos de jovens plantas descendentes de 'Royal Gala', com 8 meses de idade.

O material utilizado nas suspensões de conídios – folhas com lesões evidentes de pedrado de macieira – foi cedido pela Eng.<sup>a</sup> Carla Fernandes (Ecofrutas), para a primeira inoculação e pelo Eng.<sup>o</sup> João Abreu (Sociedade Agrícola da Terra de Eira), para a segunda inoculação.

Para obter cada suspensão colocaram-se 2 folhas, com abundantes lesões de pedrado, num tubo tipo *Falcon* preenchido com água destilada, o tubo foi agitado no “vortex” para promover a libertação dos esporos; as folhas foram retiradas do tubo e colocadas num novo tubo. De seguida fez-se uma centrifugação da suspensão durante 5 min a 8000 rpm (temperatura ambiente). A maior parte da água foi retirada com a ajuda de uma pipeta de Pasteur, ficando no tubo um volume de 4 mL. A concentração da suspensão foi determinada ao microscópio com a ajuda de uma câmara de Neubauer, sendo ajustada a uma concentração final de  $3 \times 10^5$  esporos/mL. Esta suspensão foi filtrada por tecido *Miracloth* esterilizado e transferida para um pulverizador manual pequeno, previamente desinfetado. Inoculou-se uma placa de 0,6 % de água de agar (0,6 g agar/100 mL) para controlo da germinação e crescimento dos esporos ao longo do tempo, a placa foi selada e mantida invertida na câmara de crescimento nas condições anteriormente referidas.

As primeiras plantas inoculadas foram as testemunhas (plantas controlo). Foram pulverizadas com água as folhas mais jovens recém-expandidas (em média 6 folhas/planta) e a estufa foi fechada, de modo a promover elevada humidade relativa e a não contaminação com patógenos exteriores. De seguida fez-se a inoculação com a suspensão de esporos, esta foi pulverizada também nas folhas jovens, visto que a susceptibilidade é maior nessas folhas. A estufa também foi fechada logo após a pulverização.

As estufas foram mantidas no Edifício do Laboratório da Horta, com temperaturas de aproximadamente 20 a 22 °C e iluminação natural.

A inoculação do material referente ao hospedeiro resistente já havia sido efectuada num estudo anterior.

### **3.1.3 – Colheita do material vegetal inoculado**

O material da primeira inoculação foi colhido 48, 72, e 96 h após a pulverização. Foram colhidas duas meias folhas às 48 e às 72 h (duas da estufa infectada e duas da estufa controlo), procedendo-se de seguida à extracção de RNA e às 96 h colheram-se todas as folhas inoculadas. Estas últimas foram congeladas em azoto líquido e mantidas a -80 °C, para posterior extracção de RNA.

As colheitas foram realizadas começando sempre pelas plantas testemunhas, abrindo a estufa e cortando as folhas inoculadas com uma ponta de bisturi esterilizada, fechando de seguida a estufa.

#### **3.1.3.1 – Monitorização microscópica da germinação dos esporos de *Venturia inaequalis***

Do material pulverizado com a suspensão e colhido às 96 h, 2 ou 3 folhas foram separadas para, em fresco, serem analisadas microscópicamente após emprego de um método de coloração dos esporos. Este método baseia-se no protocolo de Preece (1959) (Anexo I) e tem como objectivo corar os esporos de *V. inaequalis*, com uma solução de fucsina (*Decolorized Basic Fuchsin*), de forma a contrastá-los com o tecido vegetal.

### **3.2 – Caracterização molecular da interacção macieira/*Venturia inaequalis***

#### **3.2.1 – Extracção de RNA para análise do padrão de regulação diferencial de genes já referenciados**

##### **3.2.1.1 – Método *standard* de extracção de RNA**

Dado que o RNA se degrada facilmente, algumas providências foram tomadas de modo a evitar contaminações por RNase. Todo o material utilizado não descartável (almofarizes, balões de *Erlenmeyer*, espátulas e provetas) foi esterilizado numa estufa a 180 °C, durante 8 h, a água destilada foi tratada com 0,1 % DEPC (foi agitada durante 3 h antes de esterilizada por autoclavagem). Os plásticos (pontas, tubos de PCR, tubos de 1,5 e 2 mL) foram imersos na dH<sub>2</sub>O tratada com DEPC não esterilizada, durante pelo menos 3 h, sendo depois esterilizados por autoclavagem, 20 min a 120 °C e 1,5 bar. Todas as soluções utilizadas na extracção de RNA foram tratadas com 0,1 % DEPC e agitadas durante pelo menos 3 h, antes de irem ao autoclave, excepto a solução Tris-HCl (que não pode ser

tratada com DEPC). A solução Tris-HCl foi preparada com dH<sub>2</sub>O tratada com DEPC não esterilizada, num frasco livre de RNases.

O método de extracção de RNA utilizado teve como base o protocolo de Chang *et al.* (1993). A extracção foi efectuada a partir das folhas, utilizando-se 5 mL de tampão de extracção e 2 % de  $\beta$ -ME por grama de tecido vegetal. O RNA foi dissolvido em 20  $\mu$ L de dH<sub>2</sub>O tratada com DEPC e mantido a -80 °C.

### **3.2.1.2 – Método rápido de extracção de RNA para monitorização da evolução da infecção**

Para avaliar o estabelecimento da interacção parasita-hospedeiro nas folhas, efectuou-se uma extracção de RNA das amostras colhidas às 48, 72 e 96 h após a inoculação. Dado que o protocolo referido em 3.2.1.1 é ligeiramente moroso, foi necessário recorrer a um método expedito de extracção de RNA, tendo-nos baseado no protocolo de Gambino *et al.* (2008). O RNA foi dissolvido em 10  $\mu$ L de dH<sub>2</sub>O tratada com DEPC.

### **3.2.2 – Quantificação do RNA extraído e obtenção de cDNA**

A quantificação e avaliação da qualidade do RNA extraído foram efectuadas num espectrofotómetro *GeneQuant Pro*, através da medição da absorvância a 230, 260 e 280 nm, segundo Sauer *et al.* (1998). Este aparelho permite calcular a concentração de RNA com base na absorvância a 260 nm. As leituras de 230 e 280 nm dão uma ideia sobre a concentração de polissacáridos e concentração de proteínas, respectivamente.

Para a quantificação do RNA fez-se uma diluição de 1:50 de amostra pura extraída com água tratada com DEPC. A calibração do espectrofotómetro realizou-se com 50  $\mu$ L de água tratada com DEPC.

A quantidade de RNA ( $\mu$ g/ $\mu$ L) foi calculada de acordo com a seguinte fórmula de conversão: OD x AO x FDI, em que OD é a absorvância ou densidade óptica medida a 260 nm, AO é a absorvância óptica do RNA (40  $\mu$ g/mL) e FDI é o factor de diluição.

O RNA extraído foi colocado num gel de formaldeído com 1,4 % de agarose (Fourney *et al.*, 1988), para observação da sua qualidade e/ou degradação. Após verificação da integridade do RNA, efectuou-se uma reacção de síntese de cDNA através do kit *SuperScript® III Reverse Transcriptase* (Invitrogen). Nesta reacção foram utilizados os seguintes reagentes, com as respectivas quantidades: 1  $\mu$ L dT<sub>VN</sub> 50  $\mu$ M, 1  $\mu$ L dNTPs<sub>DEPC</sub> 10 mM, 4  $\mu$ L 5x First-Strand Buffer (constituído por 250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 1  $\mu$ L DTT 0,1 M, 1  $\mu$ L RNase inhibitor (40 U/ $\mu$ L), 1  $\mu$ L enzima Reverse Transcriptase (200 U/ $\mu$ L). A síntese foi realizada com 3  $\mu$ g de RNA, completando com dH<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> o volume de 13  $\mu$ L. A mistura de RNA foi primeiro desnaturada 5 min a 65 °C, arrefecendo depois até 4 °C, passo em que se

adicionou o mix com 5x buffer, DTT, RNase inibitor e a enzima. A reacção foi então incubada 60 min a 50 °C e seguidamente inactivada 15 min a 70 °C.

### 3.2.3 – Reacções de amplificação por PCR

O cDNA obtido foi utilizado numa reacção de PCR, utilizando iniciadores específicos, enumerados no Quadro 3.

**Quadro 3:** Iniciadores utilizados nas reacções de PCR

<b>Iniciador</b>	<b>Sequência</b>	<b>Comprimento</b>	<b>Tm (°C)</b>
<b>18S-F</b>	5' GATAAAAGGTGCGACGCGGACT 3'	21 nt	64
<b>18S-R</b>	5' GACCCAACCCAAGGTCCAAC 3'	21 nt	66
<b>MDPGIP</b>	5' CAACCCGCCATTGCCAAGC 3'	19 nt	62
<b>PGIP-R</b>	5' TTTGCAGCTTGGGAGTGGAGC 3'	21 nt	66
<b>M2-F</b>	5' CTCCTCGGGTTTCATTACG 3'	20 nt	62
<b>M2-R</b>	5' GGTGACTTGGTGATCGAGAC 3'	20 nt	60
<b>M3-F</b>	5' AATTCTTGGTGGGTGGCCTC 3'	20 nt	62
<b>M3-R</b>	5' TCAAAGGTGGAAGGATGACG 3'	20 nt	60
<b>M4-F</b>	5' CATTGGCATTTTCATCGTCTT 3'	21 nt	58
<b>M4-R</b>	5' TGGCTTGACTGCTCAACATC 3'	20 nt	60
<b>M6-F</b>	5' GACAGGAGGTGGAACCATGT 3'	20 nt	62
<b>M6-R</b>	5' TCACCGGAAAATGTGCAATA 3'	20 nt	56
<b>M9-F</b>	5' GGTTTGGTGGGAAGACAAGA 3'	20 nt	60
<b>M9-R</b>	5' GATTGCTCTAACCGCGAAG 3'	20 nt	60
<b>M10-F</b>	5' GTCGAGGATGACACTGCACA 3'	20 nt	62
<b>M10-R</b>	5' CCAATCCCATTCACCATTTTC 3'	20 nt	58
<b>M13-F</b>	5' ACTTCGAAGGCGAAAACGAC 3'	20 nt	60
<b>M13-R</b>	5' ACCCCTTTCCAGTTGACCTC 3'	20 nt	62
<b>N3021-F</b>	5' ATCCAGGGCTCGTCACATAC 3'	20 nt	62
<b>N3021-R</b>	5' TGCTTTGGAGTTGTTGGTGAG 3'	21 nt	62
<b>N54-F</b>	5' GACCCAGGAAGCTGTGTAGA 3'	20 nt	62
<b>N54-R</b>	5' CTTTACTCCCCACAACATGG 3'	20 nt	60
<b>N910-F</b>	5' TGCATGGATCTTGCTGGTAG 3'	20 nt	60
<b>N910-R</b>	5' GACCGCTTGTGCTGACTGTA 3'	20 nt	62

Os iniciadores tinham sido previamente sintetizados amplificando fragmentos de 450 pb (18S), 660 pb (PGIP), 348 pb (M2), 336 pb (M3), 391 pb (M4), 335 pb (M6), 321 pb (M9), 305 pb (M10), 307 pb (M13), 535 pb (N3021), 326 pb (N54), 342 pb (N910). Cada reacção de amplificação foi realizada num volume final de 25 µL em tubos tipo eppendorf de 500 µL, contendo o Tampão *Dream Taq* 1x da Fermentas, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 µM de cada primer e 0,5 U/reacção de *Dream Taq* DNA polimerase.

As reacções de amplificação decorreram no termociclador *Biometra UNO-Thermoblock*, com tampa aquecida. Os ciclos incluíam um passo de desnaturação inicial de cDNA durante 3 min a 94 °C, seguindo-se 35 ciclos de desnaturação de 45 s a 94 °C, o emparelhamento dos iniciadores durante 1 min à  $T_a$  ( $T_a = T_m - 2$ ) ideal para cada par de iniciadores (tendo em conta a  $T_m$  mais baixa do par) e um período de extensão de 1 min e 30 s a 72 °C, com um passo de extensão final de 10 min a 72 °C.

### 3.2.4 – Observação de produtos de PCR

Para a observação dos produtos de PCR, utilizaram-se 10 µL da reacção de PCR, que foram separados por electroforese num gel de 2 % de agarose com o corante GreenSafe (0,025 µL/mL), com tampão TAE 1x, durante 1 h a 120 V, tendo sido utilizado para comparação um marcador *100 bp DNA Ladder* (500 ng, Fermentas – Anexo II). O gel foi observado, num transiluminador, através de luz ultravioleta.

### 3.2.5 – RT-qPCR

Para analisar a expressão dos diferentes fragmentos em cada amostra de cDNA (Florina<sub>H2O</sub>/Gala<sub>H2O</sub>, Florina<sub>Vi</sub>/Gala<sub>Vi</sub>), foi utilizada a técnica de PCR em tempo real. As quantidades utilizadas basearam-se no protocolo de *SsoFast EvaGreen* (Bio-Rad). Para uma reacção de 20 µL, utilizaram-se 10 µL de *SsoFast EvaGreen SuperMix* (este é um conjunto de reagentes duas vezes concentrado, pronto a usar) e 0,8 µL (250 nM de concentração final) de cada iniciador (10 pmol/µL), sendo a quantidade de cDNA variável (para cada par de H<sub>2</sub>O/Vi usava-se as quantidades que garantissem amplificação equivalente do 18S). O ensaio de inoculação artificial e a extracção das duas amostras de 'Florina' tinham sido previamente realizados, sendo que o cDNA foi sintetizado como anteriormente descrito. As amostras foram analisadas no termociclador *MiniOpticon Real Time PCR System*, pertencente à "Bio-Rad". O programa utilizado foi o seguinte: um passo de desnaturação a 95 °C de 3 min, seguindo-se de 39 ciclos de desnaturação a 95 °C, de 10 s, emparelhamento dos iniciadores durante 5 s a 54 ou 55 °C, consoante os iniciadores utilizados na reacção e um passo de extensão a 60 °C de 5 s. Programou-se uma *melting curve* entre os 65 °C e os 90 °C, sendo que cada uma das temperaturas tinha 5 s de duração. Os iniciadores utilizados foram os mesmos do PCR convencional, à excepção dos

iniciadores para o fragmento N910, estes foram desenhados conforme as especificações do fabricante e a suas sequências são as seguintes: qN910-F – 5'GCATGGATCTTGCTGGTAGT 3' ( $T_m = 60^\circ\text{C}$ , 20 nt) e qN910-R – 5'GTGGGATCGATGAAGACAAG 3' ( $T_m = 60^\circ\text{C}$ , 20 nt).

As amostras utilizadas nesta técnica eram diluições dos cDNAs originais. Para cada amostra fizeram-se três repetições.

### 3.2.5.1 – Método matemático de comparação de Ct ( $\Delta\Delta\text{Ct}$ )

Os cálculos para cada gene e amostra foram efectuados recorrendo às seguintes fórmulas aritméticas (1.1, 1.2, 1.3) (Pfaffl, 2001).

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{gene}} - \text{Ct}_{\text{18S}} \quad (1.1)$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{Vi}} - \Delta\text{Ct}_{\text{H}_2\text{O}} \quad (1.2)$$

$$\text{ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} \quad (1.3)$$

### 3.3 – Alongamento de fragmentos utilizando a tecnologia RACE (*Rapid amplification of cDNA ends*)

A técnica de alongamento de fragmentos (RACE) foi efectuada através do kit *SMARTer<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification* (Clontech). Os iniciadores foram desenhados conforme o protocolo do SMARTer<sup>TM</sup> RACE, com 23-28 nucleótidos e com um alto teor em GC (> 50%), o que permite que o emparelhamento dos iniciadores se dê a uma temperatura alta (> 65 °C). Só se desenharam iniciadores 5', utilizando o software *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), pois era nesta direcção que se queria alongar a cadeia. Os iniciadores utilizados encontram-se no Quadro 4.

**Quadro 4:** Iniciadores utilizados na técnica RACE

Iniciador	Sequência	Comprimento	$T_m$ (°C)
<b>5RM6</b>	5' CGAGCTGACGTAATCACGAGGAACAA 3'	26 nt	80
<b>5RM9</b>	5' CAGCAGGGAGAATATGGATGCCAGAA 3'	26 nt	80
<b>5RM10</b>	5' CGTTGTACCCCAACTCGTACCACAGC 3'	26 nt	80
<b>5RM13</b>	5' TGATGATGACTAGGACCGGAGGATGC 3'	26 nt	78



As reacções RACE foram efectuadas segundo o protocolo do fabricante, no termociclador *Biometra UNO-Thermoblock*, usando 1 µg de RNA de Florina<sub>vi</sub> e 10 µg de Gala<sub>vi</sub>, para a produção de *pools* de cDNA 5'. As quantidades usadas na reacção foram as seguintes: 34,5 µL PCR-Grade Water, 5,0 µL 10x Advantage 2 PCR Buffer, 1,0 µL dNTP Mix (10 mM), 1,0 µL 50x Advantage 2 Polymerase Mix, 2,5 µL 5'-RACE-Ready cDNA, 5,0 µL Universal Primer Mix (10x) e 1,0 µL iniciador (5RM9, 10 pmol/µL). As temperaturas e os tempos foram programados consoante o manual do fabricante, havendo uma ligeira alteração em algumas temperaturas, o programa utilizado está descrito no Quadro 5. Após os 37 ciclos de amplificação, 5 µL de cada amostra foram analisados por electroforese em gel de 2 % de agarose 1x TAE e visualizadas como anteriormente descrito.

**Quadro 5:** Programa para a reacção RACE

Número de ciclos	Temperatura	Tempo
5	1º - 94 °C	30 s
	2º - 70 °C (72 °C no fabricante)	3 min
5	1º - 94 °C	30 s
	2º - 68 °C (70 °C no fabricante)	30 s
	3º - 72 °C	3 min
37	1º - 94 °C	30 s
	2º - 68 °C	30 s
	3º - 72 °C	3 min

As amostras com bandas bem visíveis foram sujeitas a nova electroforese (a 80 V durante 1h30min) num gel preparativo de 1,5 % de agarose 1x TAE, com um poço preparado para uma grande quantidade de amostra (45 µL), juntamente com 1/5 do volume de bromofenol. As amostras foram visualizadas em câmara escura com a ajuda de um transiluminador. As bandas foram cortadas, colocadas num tubo do tipo *Eppendorf*, sendo os tubos pesados sem e com fragmento de agarose. As diferentes amostras foram purificadas segundo o protocolo de *Concert Gel Extraction Systems (Rapid Gel Extraction Protocol)* (GibcoBRL).

### 3.4 – Clonagem dos fragmentos

#### 3.4.1 – Reacção de ligação

A ligação do produto de PCR obtido ao vector pCRII (Anexo III) foi conseguida pelo método TA utilizando o vector contido no kit *TA Cloning® Dual Promoter (pCR®II)* da Invitrogen. Esta

reação tem como objectivo proporcionar uma estratégia de clonagem para inserção directa de um produto de PCR num plasmídeo. Este passo foi efectuado com 1 µL da enzima “T4 DNA Ligase” (4,0 unidades Weiss da Fermentas), 1 µL de 10X tampão de ligação, 2 µL do vector pCR®II e 6 µL de dH<sub>2</sub>O, as amostras foram colocadas no termociclador Biometra UNO-Thermoblock a 22 °C, durante pelo menos 16 h. A reação foi parada através da desnaturação a 65 °C, durante 15 min.

### **3.4.2 – Transformação em *E. coli***

#### **3.4.2.1 – Preparação de bactérias competentes**

Inoculou-se uma cultura líquida de 2,5 mL de LB (Luria-Bertani) que partiu de um stock de *Escherichia coli* T. Escherich. estirpe DH5-α armazenada a -80 °C.

Fizeram-se crescer bactérias *E. coli* em 2,5 mL de meio LB, a 37 °C e 170 rpm por 18 h. Após o tempo de incubação transferiu-se o inóculo para um frasco com 250 mL de meio LB e fez-se crescer, a 37 °C e 170 rpm, até a OD atingir 0,3-0,4, aproximadamente 3 h. Ao fim deste período, o inóculo foi centrifugado a 4 °C e 3000 rpm por 10 min em tubos de 50 mL e o precipitado recuperado de cada 50 mL foi ressuscitado em 5 mL de uma solução contendo meio LB e meio LB<sub>comp</sub> (PEG 3350 20 % p/v, 20 000 mg; DMSO 10 % p/v, 10 mL; MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 1010 g; LB Broth 0,5x, 50 mL, dH<sub>2</sub>O, até 100 mL), em partes iguais. Esta solução de bactérias competentes foi depois aliquoteada em 200 µL para tubos de 1,5 mL, previamente autoclavados e refrigerados, que foram submetidos a um choque térmico com azoto líquido. Por fim, armazenaram-se no congelador a -80 °C.

#### **3.4.2.2 – Obtenção da molécula recombinante e transformação**

As ligações, anteriormente descritas, foram introduzidas em 100 µL de bactérias *E. coli* competentes por choque térmico, como indica o fabricante (TA Cloning® Kit Dual Promoter (pCR®II) da Invitrogen); neste passo, o protocolo sofreu uma ligeira alteração tendo o choque térmico uma duração de 40 s, seguindo-se a adição de 900 µL de solução SOC. Após incubação durante 1 h a 37 °C e 170 rpm, as culturas foram centrifugadas 2-3 min a 13 000 rpm, e retirou-se o meio de cultura até obter um volume final de 250 µL, os *pellets* foram ressuscitados com a ajuda de um vortex e os 250 µL foram plaqueados em duas placas (125 µL em cada placa) contendo meio LB com canamicina (50 µg/mL), 35 µL X-Gal (50 mg/mol) e 20 µL IPTG (0,1 M). As placas foram colocadas numa estufa a 37 °C, durante, pelo menos, 18 h.

### 3.5 – Purificação de DNA plasmídico

#### 3.5.1 – PCR de colónias e inoculação em meio líquido

Para conhecer o sucesso da transformação efectuou-se um PCR de colónias, ou seja, foram escolhidas as colónias brancas mais promissoras e testaram-se entre 6 a 10 colónias por construção numa reacção de PCR. Fez-se uma reacção de 20 µL com Tampão *Dream Taq* 1x da Fermentas, 0,2 mM de dNTPs, 0,2 µM de cada iniciador e 0,4 U/reacção de *Dream Taq* DNA polimerase, à qual se adicionou, com a ajuda de uma ponta esterilizada, a colónia. A reacção de PCR foi realizada com os iniciadores específicos do vector pCRII – T7 SEQ e M13pUC-48rev (ver Quadro 6) – segundo as condições indicadas ( $T_a = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Ao mesmo tempo, fez-se uma placa-mãe (de meio LB com canamicina (50 µg/mL) com X-Gal e IPTG) para stock das colónias testadas, esta placa foi colocada invertida a 37 °C, durante, pelo menos, 18 h.

Após o resultado da reacção de PCR, visualizado num gel de 2 % de agarose como anteriormente descrito, escolheram-se as colónias positivas. Prepararam-se tubos de vidro com 1,5 mL de meio LB líquido com canamicina (50 µg/mL) e nestes foram colocadas as colónias da placa-mãe com a ajuda de um palito esterilizado; os tubos foram mantidos em banho-maria a 37 °C, com uma agitação de 170 rpm, por, pelo menos, 16 h. Ao fim das 16 h, foi possível ver que o meio de cultura se tinha tornado turvo, sinal de que as culturas de bactérias tinham crescido.

Das culturas líquidas obtidas foi extraído o DNA plasmídico, em pequena escala. Este procedimento foi efectuado segundo protocolo que se intitula “Small-scale preparations of plasmid DNA” (“minipreps”), de Sambrook *et al.* (1989). O protocolo foi modificado no sentido de realizar uma digestão de RNA (30 min a 37 °C com RNase (0,01 mg/mL de concentração final) seguida de extracção com clorofórmio: álcool isoamílico) antes da precipitação do DNA. O DNA plasmídico extraído foi utilizado numa reacção PCR, com os iniciadores específicos do vector, para subsequente purificação.

**Quadro 6:** Iniciadores específicos do vector pCRII

Designação do iniciador	Vector	Tamanho	Sequência	T <sub>m</sub> (°C)
T7SEQ	pCRII	21 nt	5' ACTAAAGGGAACAAAAGCTGG 3'	60
M13pUC-48rev	pCRII	24 nt	5' CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC 3'	78

### 3.5.2 – Digestão enzimática

Neste trabalho foram realizadas reacções de digestão enzimática como forma de confirmar o sucesso da integração do fragmento no vector. Duas enzimas de restrição foram usadas, EcoRI e Bam HI. Para uma reacção de 10 µL utilizaram-se as seguintes quantidades: 1 µL tampão 10x (EcoRI ou Bam HI), 0,8 µL enzima (EcoRI ou BamHI, 10 U/µL) e 3 µL de amostra de DNA plasmídico. A digestão decorreu durante 2h a 37 °C. As amostras foram sujeitas a electroforese (120 V, durante 1h), num gel de 1,2 % de agarose 1x TAE e observadas posteriormente num transiluminador.

### 3.5.3 – Purificação dos fragmentos amplificados para sequenciação (“QIAquick PCR Purification Kit Protocol”)

Para que os produtos de PCR do DNA plasmídico sejam sequenciados é necessário purificá-los. A purificação foi efectuada utilizando o kit “QIAquick® PCR Purification” (QIAGEN), partindo-se de uma reacção de PCR com um volume total de 100 µL.

A sequenciação dos fragmentos obtidos foi realizada na empresa STAB VIDA (Caparica), de acordo com o método de Sanger *et al.* (1977).

### 3.5.4 – Análise das sequências

As sequências obtidas foram processadas com recurso ao software Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) e alinhadas recorrendo ao software ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Para analisar as homologias utilizou-se o software BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## 4 – Resultados

### 4.1 – Ensaio de inoculação artificial de plantas de macieira

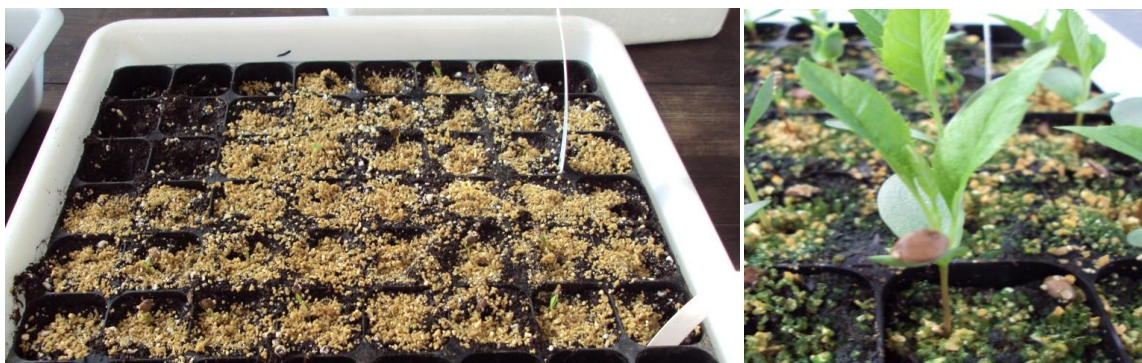
#### 4.1.1 – Obtenção de plântulas de macieira descendentes de 'Royal Gala'

Das 100 sementes de 'Royal Gala' colocadas em placa para germinação (Figura 5) germinaram 71, das quais 45 haviam sido tratadas com ácido giberélico ( $GA_3$ ) e 26 não. O sucesso de germinação global foi de 71 %.



**Figura 5:** Sementes de 'Royal Gala' em caixas de Petri.

As sementes germinadas (com e sem  $GA_3$ ) foram depois transplantadas para tabuleiros alveolados (Figura 6).



**Figura 6:** Tabuleiros alveolados com sementes já germinadas de 'Royal Gala'.

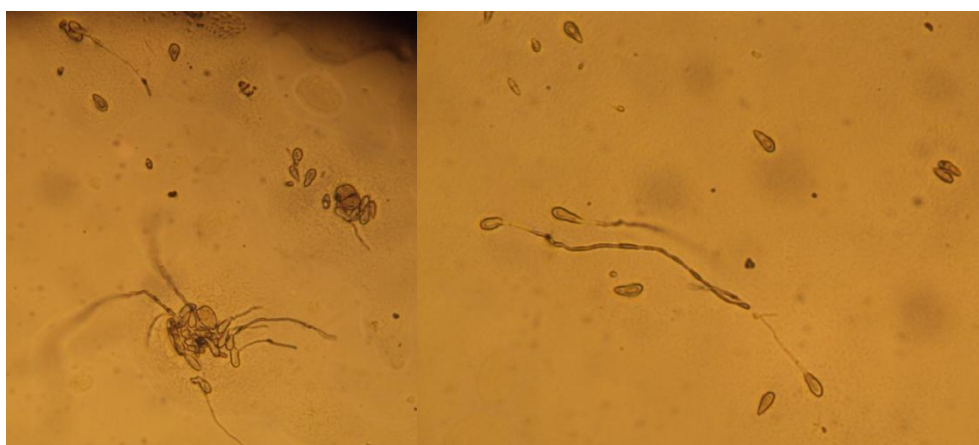
13 das plântulas não evoluíram, 58 plantas foram posteriormente envasadas em vasos de plástico, como se observa na Figura 7.



**Figura 7:** Plantas descendentes de 'Royal Gala' transplantadas para vasos de plástico.

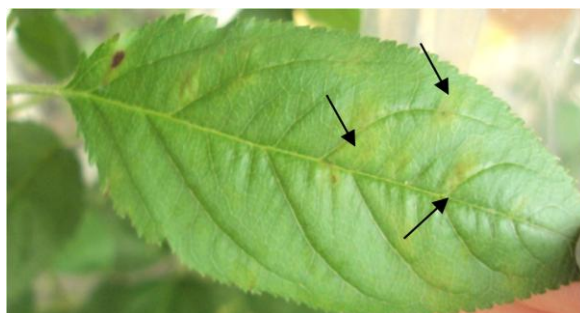
#### 4.1.2 – Inoculação do material vegetal

O material infectado que constituiu a fonte de inóculo foi fornecido no início de Maio, altura em que o fungo começou a aparecer nos pomares. Aquando do primeiro ensaio de inoculação artificial, realizado no dia 9 de Maio de 2011, a monitorização dos esporos de pedrado pulverizados numa placa com 0,6 % de água de agar (Figura 8) evidenciou germinação às 48h, mostrando que o inóculo se encontrava activo.



**Figura 8:** Conídios de *Venturia inaequalis* germinados em 0,6 % de água de agar, 48 h após a inoculação (10x).

Uma segunda inoculação realizada com inóculo fornecido pelo Eng.<sup>o</sup> João Abreu, foi efectuada para observação das lesões provocadas pelo fungo, esta foi realizada no dia 30 de Maio e as folhas só foram colhidas no dia 30 de Junho. Ao longo deste tempo foi possível verificar o desenvolvimento das lesões em algumas folhas, como se pode observar na Figura 9.

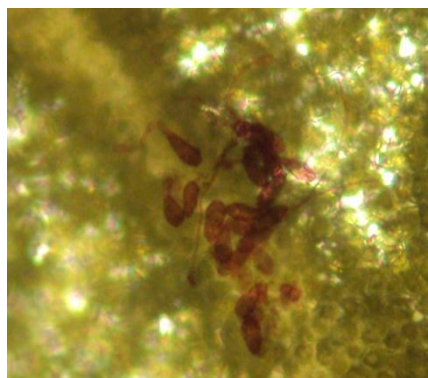


**Figura 9:** Sintomas de pedrado nas folhas de descendentes de 'Royal Gala' (2ª inoculação), um mês após a inoculação.

## 4.2 – Interacção parasita-hospedeiro

### 4.2.1 – Monitorização microscópica da germinação dos esporos de *Venturia inaequalis*

Para controlar a germinação dos esporos *in vivo*, ou seja, na planta, o material vegetal foi corado como descrito em 3.1.3.1. Esta técnica cora só os esporos de pedrado, diferenciando-se bem os esporos do material vegetal (Figura 10). Esta monitorização foi efectuada às 96 h. Verificou-se que a germinação ocorreu maioritariamente nervuras nas das folhas (principais e secundárias).



**Figura 10:** Esporos de *Venturia inaequalis* corados e germinados, 96 h após a inoculação.

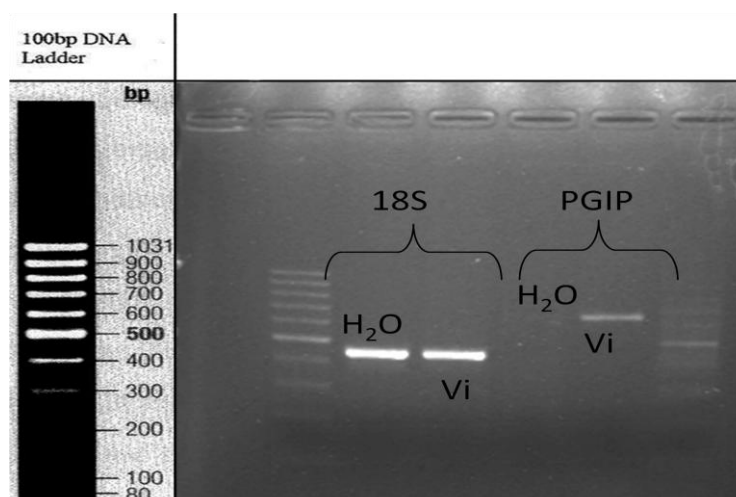
### 4.2.2 – Análise ao nível molecular

#### 4.2.2.1 – PCR convencional

Como já dito anteriormente, após inoculação para análise molecular da interacção patógeno-hospedeiro susceptível, foram realizadas três colheitas de amostras, às 48, 72 e 96 h. Foi efectuada a extracção de RNA, a síntese de cDNA de amostra infectada e inoculada com água e posteriormente reacções de PCR com os iniciadores 18S-F/18S-R para normalizar as quantidades de cDNA e com os iniciadores MDPGIP-F/PGIP-R que servem de indicador da interacção, pois foi já verificado anteriormente que há activação de genes de PGIP do hospedeiro aquando da penetração do fungo na interacção macieira-pedrado. Às 48 h e 72 h não foram visíveis diferenças na acumulação de produto de PGIP,



ao contrário do que se verificou às 96 h. Na Figura 11 é possível observar o gel resultante da electroforese, neste vê-se que a amplificação de 18S foi homogénea nas duas amostras (normalização das quantidades de cDNA) e que há uma sobre-expressão dos genes de PGIP na amostra inoculada com *V. inaequalis*, reflectindo a interacção parasita-hospedeiro.



**Figura 11:** Resultado do PCR da 1ª inoculação, 96 h após a inoculação.

Optou-se assim por parar o ensaio de inoculação artificial, colhendo as amostras para as análises de qPCR, de forma a analisar a regulação dos genes de interesse no início da interacção.

#### 4.2.2.2 – Real-Time PCR ou qPCR

A técnica qPCR tem como objectivo analisar quantitativamente a acumulação de produtos amplificados, na fase exponencial da reacção. Vários iniciadores foram utilizados nestas reacções que usam cDNA como amostra de partida (RT-qPCR) (M3, M6, M9, M10, M13, N3021, N54 e N910), para além dos iniciadores 18S-F/18S-R (gene constitutivo para normalização da quantidade de cDNA) e MDPGIP-F/PGIP-R (gene marcador da interacção). Para o hospedeiro susceptível, para cada momento de colheita e para cada amostra Gala<sub>H<sub>2</sub>O</sub> e Gala<sub>Vi</sub> correspondendo respectivamente a plântulas descendentes de 'Royal Gala' inoculadas com água e com *V. inaequalis*, realizaram-se as amplificações com os diferentes pares de iniciadores. Para o hospedeiro resistente a inoculação e extracção de RNA tinham sido anteriormente feitas, os cDNAs preparados e as amplificações realizadas para as amostras Flo<sub>H<sub>2</sub>O</sub>/Flo<sub>Vi</sub> corresponderam apenas a 96 h após inoculação. Para normalização dos valores de 'threshold', foram aferidas várias quantidades de cDNA das diversas amostras (Gala<sub>H<sub>2</sub>O</sub>/Gala<sub>Vi</sub> (48, 72 e 96 h) e Flo<sub>H<sub>2</sub>O</sub>/Flo<sub>Vi</sub>) e foram aceites valores de Ct entre 20 e 23. Para a amplificação com os iniciadores 18S fizeram-se de seguida amplificações de séries de diluições, para verificar a eficiência da reacção (resultados não apresentados). Após a normalização, testaram-se as amostras com o par de iniciadores MDPGIP-F/PGIP-R



para confirmação ou não da interacção e com os iniciadores referentes aos genes de interesse.

Para uma melhor compreensão dos resultados, utilizou-se o método matemático de comparação de Ct (método  $\Delta\Delta C_t$ , ver ponto 3.2.5.1). Esta fórmula tem como base o estudo matemático da diferença de expressão entre a amostra infectada ( $Gala_{Vi}$  ou  $Flo_{Vi}$ ) e a amostra controlo ( $Gala_{H_2O}$  ou  $Flo_{H_2O}$ ) e dá como resultado se houve ou não sobre-expressão do gene em causa, na interacção.

Os resultados das expressões dos genes ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) são observáveis nos Quadros 7 e 8 (resultado do RT-qPCR em anexo – Anexo IV). Para interpretação dos resultados é necessário saber que quando  $2^{-\Delta\Delta C_t} > 1$  (aumento) houve sobre-expressão, quando  $2^{-\Delta\Delta C_t} < 1$  (diminuição) houve repressão e quando  $2^{-\Delta\Delta C_t} = 1$  os genes podem ser considerados constitutivos.

**Quadro 7:** Expressão dos genes em estudo (resultado do  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , estas reacções foram realizadas com uma  $T_a = 54\text{ }^\circ\text{C}$  ou  $T_a = 55\text{ }^\circ\text{C}$ ), em plântulas descendentes do hospedeiro susceptível ('Royal Gala')

Genes	$2^{-\Delta\Delta C_t}$		
	Susceptível ('Royal Gala')		
	48h	72h	96h
PGIP	0,405	2,510	4,808
	0,332	2,232	4,580
	0,177	2,126	3,909
M3	0,518	1,266	2,984
	0,439	0,332	3,599
	0,605	0,281	10,067
M6	0,027	1,844	3,112
	0,023	1,865	2,963
	0,014	1,578	3,345
M9	1,366	7,080	11,391
	1,001	5,199	9,615
	1,061	4,853	8,308
M10	3,925	8,166	9,349
	3,505	7,145	9,746
	3,795	7,024	8,781
M13	5,914	3,027	3,028
	2,629	3,568	4,249
	0,740	2,012	3,781

**Quadro 7 (continuação):** Expressão dos genes em estudo (resultado do  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , estas reacções foram realizadas com uma  $T_a = 54\text{ }^{\circ}\text{C}$  ou  $T_a = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), em plântulas descendentes do hospedeiro susceptível ('Royal Gala')

Genes	$2^{-\Delta\Delta Ct}$		
	Susceptível ('Royal Gala')		
	48h	72h	96h
N3021	10,448	3,996	4,217
	2,656	3,331	3,866
	7,972	4,810	3,372
N54	2,139	5,697	4,261
	2,138	5,973	3,937
	1,628	5,029	3,888
N910	0,548	0,793	6,528
	1,564	1,327	5,548
	0,780	1,003	4,592

Com esta abordagem a interacção no hospedeiro susceptível foi verificada às 72 h, através da análise feita ao gene PGIP ( $2^{-\Delta\Delta Ct} > 1$ ), este resultado mostra-se diferente do obtido com o PCR convencional, pois neste às 72 h ainda não se tinha observado a activação da interacção.

Ao analisar os valores obtidos através do par de iniciadores M3, constata-se que às 48 h ainda não havia ocorrido activação do gene. Às 72 h os resultados não são muito conclusivos mas às 96 h já se observa a sobre-expressão clara do mesmo. O gene que é considerado de resistência (M6) tem um aumento da sobre-expressão ao longo do tempo. Às 48 h ainda não havia ocorrido resposta, no entanto às 72 h já se observava a sobre-expressão, sucedendo o mesmo às 96 h aqui de forma mais intensa. Este aumento gradual ao longo do tempo foi também verificado para os iniciadores M9 e M10, no hospedeiro susceptível, no entanto para estes dois fragmento já havia ocorrido interacção às 48 h. O fragmento correspondente ao par de iniciadores M13 apresenta sobre-expressão nas 3 colheitas realizadas para o hospedeiro susceptível, mantendo-se aproximadamente o mesmo nível de activação.

Em relação aos fragmentos N3021 e N910 no hospedeiro susceptível, houve sobre-expressão na amostra infectada mas esta não aumentou de intensidade com o tempo, pelo contrário, em relação ao N3021 até diminuiu. O fragmento N54, que corresponde a um gene relacionado com respostas a stresses, apresentou sobre-expressão nas 3 datas de colheita, sendo que a sua expressão aumentou às 72 h, diminuindo depois às 96 h.

Os resultados obtidos para o hospedeiro resistente apresentam-se no Quadro 8.

**Quadro 8:** Expressão dos genes em estudo (resultado do  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , estas reacções foram realizadas com uma Ta = 54 °C ou Ta = 55 °C), na cultivar resistente 'Florina', 96 h após inoculação

	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
Genes	Flo (resistente)
PGIP	44,894
	43,297
	38,092
M9	53,580
	62,351
	75,984
M10	10,676
	15,323
	16,367
N3021	19,368
	2,913
	3,098
N910	58,307
	49,564

No hospedeiro resistente verifica-se sempre, nas condições ensaiadas, a sobre-expressão do genes em estudo (M9, M10, N3021 e N910) na amostra inoculada com *V. inaequalis*, sobre-expressão essa que é muito mais intensa que no hospedeiro susceptível. Para esta cultivar não se fizeram análises para M3, M6, M13 e N54 dado que o stock de cDNA de 'Florina' havia acabado.

#### 4.3 – Amplificação de regiões codificadas por RACE

A técnica RACE (*Rapid Amplification cDNA Ends*) tem como objectivo alongar sequências de cDNA. Este método permite a amplificação de regiões codificadas desconhecidas, requerendo somente o conhecimento de uma pequena sequência que esteja dentro do mRNA de interesse e é por isso utilizada para clonar as extremidades 5' ou 3' de um cDNA incompleto (Frohman *et al.*, 1988 *cit. in* Mota, 2002). Foram desenhados quatro iniciadores (5RM6, 5RM9, 5RM10, 5RM13), com base em sequências já conhecidas (M6, M9, M10 e M13), obtidas por Mota (2002) através da técnica DDRT-PCR. Estes foram desenhados para alongar a sequência na extremidade 5'.

Nestas reacções utilizou-se RNA de Gala<sub>Vi</sub> (extraído a 27-05-2011 das plantas obtidas por semente) e de Flo<sub>Vi</sub> (extraído anteriormente pela Dr.<sup>a</sup> Mariana Mota), para criar as *pools* 5'. Das reacções efectuadas só com o iniciador 5RM9 verificou-se o aparecimento de duas bandas nas duas amostras. Após clonagem e purificação do DNA plasmídico, sequenciou-se o clone pertence à amostra Flo<sub>Vi</sub> (uma vez que a região codificadora anteriormente

estudada era de 'Florina'). A análise da sequência revelou que se conseguira uma amplificação significativa (de 851 pb) da região codificadora na extremidade 5' mas que ainda nos encontrávamos muito longe do início desta região, pelo que não se conseguiu identificar a região codificadora completa. No entanto, a homologia estabelecida pela análise BLAST fazendo uso da sequência disponível total é muito clara, apontando indubitavelmente para um gene codificador da celulose sintase.

De seguida apresenta-se a sequência obtida.

```
5' AATCACTCTTGAAAGAAGTCATTCCACTGTCATATATTGTTGCTAAGAAGATAATTCTGATGGGGGAAA
GAGGTAGTTGAATCTATGGCTTCTGTTGCAGAGGATATCCTAACGGGATTCAAGATGCATTTTCATGGCTG
GCGATCTGTGTATGCATGCCCCAAGAGGCCTGCATTCAAGGGTTCTGTTCTATTAACCTTGTCAGATCGGCTT
CACCAGGTGCTTCGGTGGGCTTTGGGATCCGTTGAAATTTTGTGAGCAGGCATTGCCCCGATTGGTATGG
ATATGGGTGTTGGTCTGAAATGGTTGGAGCGCTTTTCTTTATATAAACTCGGTTGTTTATCCTTTAACATCC
ATCCCCCTTGCTTGCGTACTGTTCCCTTGCCGGCGTCTGCTCCTTACTGGGAAATTTATTGTCCTTGAGAT
TAGCAACTATGCCAGCATCCTTTTTATGGCTCTCTTTTGTCCATCGCTGCAACGAGCATACTTGAGATGC
AATGGGGACATGTTGGCATCCACGACTGGTGGAGGAATGAACAGTTCTGGGTGATTGGTGGTGCATCA
CACTTCTTCGCACTCATCCAGGGTCTGCTCAAGGTTTTGGGTGGTGTGAACACAACTTCACTGTCACATC
AAAAGCAGCAGATGATGGAGAGTTTTCCGACCTATACCTCTTCAAGTGGACGTCACCTTTGATCCCGCCCA
TGACCTTATTGATCATAAACATAATTGGAGTCGTAGTTGGAATTTTCAGATGCCATCAACAATGGTTACGAA
ACATGGGGTCCTCTCTTTGGTAGGCTGTTCTTTGCCATTTGGGTCATCGTCCATCTTTACCCGTTCTCTAAA
AGGTTTTGGTGGGAAGACAAGAGAGACTGCCGACCATCATTGTGGTGTGGTCAATTCCTCTGGCATCCATAT
TCTCCCTGCTGTGGGTGCGAATCAATCCATTTGTGAATAAGGGTGGCATTGTACTAGAAGTTTGCGGGCTG
GATTGTAACTGAGATCGCTATAGAGAAGAAGGCTTAGACAGTGTGAGTTCTGTAGAAAAGCTGTTTGGACA
GAAAACAAAGAAAGGATCCAAGTTCCAAGTGCGCGACCGAAGGAAGGTAAAGTTGTTTCAAACAGTTTGTA
TTCGTAAAAGGATAAATCTTCGCGGTTAGAGCAAATCAAGCCGAATTC 3'
```

A sequência total do clone acima descrita encontra-se dividida por cores para melhor compreensão. A azul encontra-se a sequência de M9 obtida através do RACE, a preto a sequência de M9 obtida através de DDRT-PCR (Mota, 2002), a verde encontra-se o local de ligação do iniciador 5RM9, a vermelho o local de ligação do iniciador M9-F2 e a cor-de-laranja o local onde se liga o iniciador M9-R2.

A análise BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) do fragmento inteiro (851 pb + 321 pb (anteriormente sequenciado)) deu uma homologia de 80 % com o gene que codifica a celulose sintase na espécie *Populus tremula* x *Populus tremuloides*, esta homologia está presente no Quadro 9.

**Quadro 9:** Grau de homologia da sequência pertencente ao fragmento M9 (celulose sintase) com outras sequências

Accession	Description	Max Score	Total score	E value	Query coverage	Max identity
XM_002306671.1	<i>Populus trichocarpa</i> predicted protein, mRNA	784	784	0	85%	81%
AY573572.1	<i>Populus tremula</i> x <i>Populus tremuloides</i> cellulose synthase (CesA2) mRNA, complete cds	767	767	0	85%	80%

**Quadro 9 (continuação):** Grau de homologia da sequência pertencente ao fragmento M9 (celulose sintase) com outras sequências

Accession	Description	Max Score	Total score	E value	Query coverage	Max identity
XM_002524253.1	<i>Ricinus communis</i> Cellulose synthase A catalytic subunit 6 [UDP-forming], putative, mRNA	638	638	3,00E-179	84%	78%
AY221086.1	<i>Solanum tuberosum</i> cellulose synthase (StCesA1) mRNA, partial cds	562	562	2,00E-156	81%	77%
XM_002878525.1	<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i> hypothetical protein, mRNA	444	444	8,00E-121	76%	76%

## 5 – Discussão de resultados

Este trabalho teve como objectivo estudar ao nível molecular a interacção a maçã e *Venturia inaequalis*, analisando o caso de um hospedeiro susceptível e o caso de um hospedeiro resistente. Para tal foi efectuada uma sementeira de sementes de 'Royal Gala', assumindo que a descendência de 'Royal Gala' é também susceptível, a inoculação de plantas jovens com inóculo proveniente de pomares infectados e posteriormente extracção do RNA das folhas para realizar os estudos de biologia molecular. Para o caso do hospedeiro resistente, a inoculação artificial e a extracção de RNA já haviam sido realizadas, pelo que os estudos debruçaram-se só sobre a síntese de cDNA e análise do padrão de expressão dos genes referenciados.

Os sintomas nas plantas descendentes de 'Royal Gala' (2ª inoculação) só foram observados algumas semanas após a inoculação e apenas em 4 folhas, porque o pedrado tem um crescimento lento e porque a virulência do fungo poderia ser menor. No entanto, o aparecimento das lesões reforça o carácter susceptível que se atribuíra à descendência de 'Royal Gala'.

Aquando da inoculação das plantas fez-se também uma pulverização numa placa de 0,6 % de água de agar, para monitorização da rapidez de germinação do fungo. Utiliza-se a água de agar para mimetizar a germinação do fungo na planta (presença de elevada humidade). 48 h após as inoculações as placas foram observadas ao microscópio sendo já observável alguns esporos germinados, sinal de que na planta poderia estar a haver interacção.

Apesar de ainda não serem visíveis os sintomas às 48, 72 e 96 h, foram estas as horas escolhidas para, na primeira inoculação, fazer colheitas de amostras para monitorizar molecularmente a interacção entre o hospedeiro e o fungo no início do processo de infecção. Estes períodos resultam de estudos anteriores (Mota, 2002) e da informação recolhida na literatura que menciona que ocorrem alterações na planta entre as 20 e as 72 h após inoculação (Chevalier *et al.*, 1991). Dado que era necessário uma certa rapidez na extracção de RNA durante o 1º ensaio de inoculação (recolha de amostras de 24 em 24 h) foi adaptado um método expedito de extracção usado por Gambino *et al.* (2008). Este método provou ter a mesma eficácia que o método standard, com a vantagem de ser mais rápido (com método standard o resultado só é obtido no dia seguinte). Foi por isso possível fazer a extracção de RNA e consequente síntese de cDNA e observação dos produtos de PCR antes de começar a fazer a extracção da colheita seguinte. É de ressaltar que nas extracções de RNA não houve tratamento com DNase, devido à reduzida quantidade de RNA (o passo de purificação a seguir ao tratamento com DNase leva a perdas significativas de RNA), podendo existir, por isso, alguma quantidade de DNA na amostra de RNA utilizado para realizar a síntese de cDNA ( reacção de transcriptase reversa). No entanto, quando se

verificou a integridade do RNA (no gel de 1,4 % de agarose com formaldeído), não foram observados vestígios de DNA.

Quando se colheram as folhas para extracção de RNA, também foram colhidas folhas para monitorização microscópica da infecção. Neste passo foram utilizadas soluções próprias (*Decolorized Basic Fuchsin*) para a coloração dos conídios. Com esta técnica expedita foi possível observar microscopicamente os esporos germinados e não germinados. A germinação ocorreu maioritariamente nas nervuras da folha (principais e secundárias), como já tinha sido observado noutros ensaios (Mota, comunicação pessoal). É normal haver também coloração noutras lesões, mas as substâncias fúngicas estão entre as mais coradas, permitindo a identificação do fungo. Através da observação microscópica verificou-se o estabelecimento da infecção.

As reacções de PCR das amostras referentes às 48 e 72 h não mostraram activação dos genes que codificam PGIP, no gel de agarose. Pelo contrário, quando se fez a reacção das 96 h, registou-se a maior acumulação dos produtos de PGIP na amostra infectada. Este resultado sugere que só às 96 h se verifica resposta forte do hospedeiro à penetração do fungo. Foi então estudar-se o padrão de expressão de genes do hospedeiro, anteriormente identificados na cultivar 'Florina' por DDRT-PCR como participando no início do processo de interacção (Mota 2002 e 2008) nas 3 datas, para avaliar se efectivamente são sobrerregulados em resposta à interacção com o fungo e podem, por isso, participar na resposta de defesa da planta. Para efeitos comparativos, desenvolveu-se a análise em amostras de hospedeiro susceptível e hospedeiro resistente; neste último realizou-se a análise molecular apenas na amostra colhida às 96 h, uma vez que nos ensaios de inoculação artificial realizados anteriormente as amostras tinham sido apenas colhidas às 96 h, não tendo sido feitas colheitas intermédias noutros momentos.

Não foi necessário desenhar iniciadores, pois Mota, em 2002 e 2008, quando estudou este tema desenhou iniciadores específicos para cada fragmento. Os genes em estudo estão relacionados com as várias respostas de defesa da planta, defendendo a hipótese de Beynon (1997) de que existe mais do que um gene de resposta a ser activado na planta (Bénaouf & Parisi, 2000) quando atacada por um patógeno.

No *Real-Time* PCR (ou qPCR) as reacções foram efectuadas com diluições de cDNA, para não haver inibição da reacção, tomando-se a quantidade de cDNA necessária para que o Ct respeitante à amplificação com os iniciadores 18S (usado como gene constitutivo de normalização) variasse entre 20 e 23 e a amplificação fosse equivalente nas duas amostras. Não se tentou normalizar a reacção no sentido de obter Ct's mais baixos, pois isso implicaria maior consumo de cDNA, o que poderia inviabilizar depois a realização de todas as reacções pretendidas. Fizeram-se sempre três replicações da mesma amostra para obter

resultados mais fidedignos. Antes de utilizar os iniciadores dos genes de interesse, testaram-se primeiro os pares de iniciadores 18S-F/18S-R e MDPGIP-F/PDGIP-R, com isto normalizou-se a reacção e aferiu-se se tinha ocorrido a activação de genes do hospedeiro em resposta à interacção parasita-hospedeiro. Com as mesmas quantidades e condições fizeram-se as reacções com os diferentes iniciadores, para perceber quais os genes que haviam sido activados (havia sofrido uma sobre-regulação) ou reprimidos nas amostras infectadas pelo fungo.

As diluições que se fizerem serviram para garantir a eficiência da reacção, foi efectuada uma escala de diluições para observar o comportamento do 18S como gene normalizador da reacção. Este gene é considerado constitutivo, ou seja, é um gene que apresenta expressão constante o que permite a normalização de diferenças existentes na quantidade inicial de RNA, em possíveis variações experimentais e na síntese de cDNA.

Conseguiu-se amplificar todos os genes em estudo. O fabricante recomenda o uso de iniciadores que permitam obter fragmentos pequenos, no entanto foram utilizados os iniciadores já existentes, à excepção do N910 (qN910) verificando-se assim que os iniciadores anteriormente desenhados também funcionavam, produzindo fragmentos com boa eficiência. A análise das 'melting curves' obtidas pelo software serve para verificar se existem isoformas no fragmento amplificado; se isto acontecer, surgem dois picos na derivada da 'melting curve' em função da temperatura. Todos os fragmentos amplificados apresentaram uma 'melting curve' simples, ou seja, não se verificava a existência de isoformas, o que leva a concluir que os iniciadores utilizados funcionaram especificamente.

A 1ª inoculação apresentou resultados satisfatórios, que sugerem um processo de resposta à interacção ao longo do tempo. O mesmo não se pôde verificar para a 'Florina' pois apenas foi testado um ponto (às 96 h). Contudo, ao comparar resultados, verificou-se uma discrepância no nível de expressão dos genes entre as duas cultivares, reflectindo talvez as diferenças entre hospedeiros susceptíveis e hospedeiros resistentes. É no entanto de frisar que estes resultados são preliminares e podem não ser exactamente reprodutíveis noutros ensaios de inoculação (há que ter em atenção que o inóculo poderá ser mais virulento e que a fase de desenvolvimento das plantas do hospedeiro influencia decisivamente a duração e intensidade de resposta desta fase inicial da interacção).

Analisando o Quadro 7 observa-se com clara nitidez que houve resposta do hospedeiro susceptível (através do par de iniciadores MDPGIP-F/PGIP-R) em todas as amostras, menos na amostra das 48 h ( $2^{-\Delta\Delta Ct} < 1$ ), o que quer dizer que por esta altura da inoculação ainda não havia ocorrido interacção, o que corrobora o PCR normal. Valores da amostra colhida a 72 h mostraram interacção, o que não aconteceu no PCR normal. As diferenças entre o resultado do PCR normal visualizado em gel de agarose e o resultado do qPCR,



para as 72 h, podem explicar-se pela menor resolução do PCR convencional (fase de amplificação que é analisada e método de análise). O quadro 8 revela também a resposta do hospedeiro resistente em termos de activação dos genes de PGIPs.

O facto de haver sobre-expressão do gene M6, leva-nos a apontar que, de facto, ele também existe no genoma desta variedade susceptível e expressa-se, todavia o fungo consegue ultrapassar a existência do mesmo, levando à conclusão que se trata de um gene recessivo. Não foi possível a realização desta reacção com a cultivar resistente, devido ao facto de o stock de cDNA de Flo<sub>vi</sub> se ter gasto, não sendo possível a comparação das duas cultivares por qPCR. Os resultados obtidos para M9 e M10 podem considerar-se esperados, na medida em que os estudos histológicos apontam para que o fungo penetra pela cutícula no espaço intercelular, verificando-se alterações na parede celular das células adjacentes tanto em hospedeiros resistentes como em hospedeiros susceptíveis. A sobre-expressão destes genes, envolvidos na síntese da cutícula e da celulose da parede celular, pode explicar algumas destas alterações. O nível de sobre-expressão, a confirmarem-se estes resultados, muito superior na 'Florina' do que no hospedeiro susceptível (embora não directamente comparáveis uma vez que não foram inoculadas com o mesmo inóculo) poderá explicar o diferente comportamento verificado a nível histológico nos dois hospedeiros. É interessante observar que o que foi analisado ao nível molecular, para estes dois iniciadores (M9 e M10), pode explicar o que se observa ao nível histológico, pois em hospedeiros susceptíveis, há degradação da parede celular no processo infeccioso, o que é concordante com os resultados do qPCR, dado que os genes de resposta da planta sofrem um aumento gradual ao longo deste tempo. Estes resultados sugerem que há, no início do processo infeccioso, algo que determina a activação destes genes (provavelmente a degradação da parede celular) começando depois os genes a codificar proteínas de defesa que, no entanto, não são expressas a níveis suficientemente elevadas para impedir que o fungo se desenvolva. Quanto aos hospedeiros resistentes, não se observa esta degradação extensa da parede celular (é apenas localizada em redor do local de penetração do fungo), sugerindo que a planta quando atacada pelo fungo, recebe logo o sinal da presença do gene de avirulência e começa o seu processo de defesa, daí os valores de sobre-expressão serem tão discrepantes quando comparados com os do hospedeiro susceptível. Os resultados apontam para que o gene codificado por M13 seja sobre-expresso logo que a planta é atacada pelo fungo, no entanto não se podem tirar conclusões concretas dado que não se sabe a função exacta do M13. Em relação aos genes N3021 e N910 a variabilidade observada nas amostras referentes às 48 h recomenda alguma prudência na análise destes dados. Para o N3021, na 'Florina', os dados obtidos também apresentaram grande variabilidade entre si, não fomentando conclusões muito robustas para além da verificação da sobre-expressão do gene na amostra infectada. Talvez por ser um gene de resposta a stresses, este poderá ser o primeiro a ter um padrão de expressão alterado, ou seja, ser um

dos primeiros genes a responder ao ataque do fungo, fazendo com que de seguida se dê a cascata de acontecimentos (activação de outros genes). Daí a sua expressão diminuir quando as outras aumentam. Quanto ao N910, não se sabe muito bem a função destes genes na planta mas são genes sinalizadores e foi postulado recentemente que poderiam intervir em reacções de resposta a stresses bióticos. Neste contexto, uma sobre-expressão mais intensa na cultivar resistente será concordante com o mecanismo de resposta à doença que esta apresenta (morte rápida das células que rodeiam o fungo – resposta de hipersensibilidade).

Os resultados obtidos para a ‘Florina’ (cultivar resistente) reiteram os resultados obtidos por DDRT-PCR, sugerindo, de facto, a sobre-regulação destes fragmentos em resposta à inoculação com *V. inaequalis*.

Estes resultados, ao envolverem a comparação das diferenças no padrão de expressão genético entre uma cultivar resistente e uma cultivar susceptível numa interacção parasita-hospedeiro podem ser relacionados com os obtidos por Degenhardt *et al.* (2005). No trabalho desenvolvido por este grupo, houve também comparação entre uma cultivar susceptível (‘Elstar’) e uma resistente (‘Remo’). O grupo verificou que os genes de defesa estudados (proteínas tais como  $\beta$ -1,3-glucanase, ‘ribonoclease-like’ PR10, protease inibidora da cisteína, endoquitinase, ferroquelatase e factor ADP-ribosilação (ARF)) são muito mais sobre-expressos na cultivar ‘Remo’ do que na ‘Elstar’, apesar de serem também transcritos na susceptível. Tal como neste estudo, o M6 (gene de resistência) aparece também no hospedeiro susceptível ‘Royal Gala’, ainda que a níveis muito inferiores, não sendo por isso considerada resistente.

A técnica RACE foi utilizada com o objectivo de ampliar algumas sequências na extremidade 5’ da região codificadora, só tendo havido sucesso no caso do fragmento M9. Os iniciadores para os outros fragmentos também foram utilizados nesta técnica, mas os resultados não foram satisfatórios. A não obtenção das outras sequências pode dever-se a diversos factores, entre eles os iniciadores não serem os mais correctos.

## 6 – Conclusão

O pedrado da macieira é a doença com maior importância na cultura em causa. O combate, que chega a implicar mais de 15 tratamentos por ano leva a que possam ocorrer problemas ambientais e também problemas com o consumidor, se os resíduos ultrapassarem os limites máximos. Hoje em dia a luta contra esta doença passa por arranjar alternativas ao uso de químicos, revelando-se o interesse e exploração de mecanismos de defesa endógenos da macieira. É já sabido que as plantas desenvolvem estratégias de reconhecimento de patógenos, activando mecanismos de defesa aquando da interacção parasita-hospedeiro.

O objectivo deste trabalho foi contribuir para o estudo da interacção *V. inaequalis*-macieira em dois genótipos, um resistente ('Florina') e um susceptível (descendentes de 'Royal Gala'), através da técnica RT-qPCR. Com vista à identificação de vias de defesa activadas ao início da infecção, deu-se particular atenção ao padrão de regulação de genes envolvidos no metabolismo da cutícula e da parede celular, dos genes com semelhanças a genes de resistência e genes de resposta a stresses bióticos e abióticos, anteriormente indentificados por DDRT-PCR (Mota 2002 e 2008).

Os ensaios de inoculação artificial do genótipo susceptível foram realizados no decurso deste trabalho, os respeitantes à cultivar 'Florina' tinham sido previamente realizados. Para o genótipo susceptível conseguiu-se estabelecer um método de inoculação artificial eficaz, aspecto evidenciado pela activação de genes de PGIP na 1ª inoculação, genes sobrerregulados em resposta ao ataque de fungos, e também pela manifestação de sintomas na 2ª inoculação. Feitas as sínteses de cDNA, as análises de qPCR revelaram que os genes em estudo são de facto sobrerregulados no decurso da interacção macieira-pedrado tanto no genótipo susceptível (descendentes de 'Royal Gala') como no genótipo resistente ('Florina'). No genótipo susceptível, verificou-se que os genes correspondentes a M9 e M10 são sobrerregulados na amostra infectada desde as 48 h de inoculação e essa sobrerregulação vai aumentando com o tempo. Os genes correspondentes a M3, M6 e N910 são também sobre-expressos na amostra inoculada mas numa fase mais tardia da interacção. Os padrões de sobre-expressão de M13, N3021 e N54 não são muito conclusivos. No genótipo resistente, os níveis de sobre-expressão na amostra infectada foram bastante mais elevados que na amostra susceptível, aspecto que pode ajudar a esclarecer a diferença de comportamento verificada nos dois hospedeiros em termos histológicos. Provavelmente, na cultivar susceptível, os genes de defesa activados no processo de infecção não são expressos a níveis que levem à defesa da planta, acabando o fungo por ultrapassá-los. Os resultados obtidos neste trabalho são concordantes com os obtidos anteriormente por DDRT-PCR (Mota 2002 e Mota & Oliveira, 2008), apesar de se tratarem de técnicas diferentes.

Neste trabalho utilizou-se a técnica RACE, com o objectivo de obter sequências codificadoras maiores para alguns dos genes envolvidos na interacção macieira-pedrado. Só se conseguiu obter um prolongamento útil para o gene correspondente à *Celulose sintase* (M9). A análise BLAST da sequência completa reforçou a homologia atribuída a um gene codificador da uma celulose sintase.

É de realçar que este trabalho é uma análise muito preliminar do padrão de regulação de certos genes envolvidos na resposta do hospedeiro ao ataque do fungo *Venturia inaequalis*. De futuro, será necessário repetir os ensaios de inoculação artificial para o hospedeiro resistente e para outros susceptíveis, de forma a poder monitorizar a evolução do padrão de expressão dos genes referenciados ao longo do tempo nos diferentes hospedeiros e fazer uma análise comparativa entre o padrão de expressão genético do hospedeiro resistente e dos susceptíveis. É de particular importância a análise do fragmento M6 na cultivar resistente, que neste trabalho não se realizou por escassez de cDNA. A qualidade da extracção do RNA, e desenho dos iniciadores para o método RACE têm também que ser optimizados por forma a melhorar o desempenho das reacções 5' RACE. Este aspecto é de grande relevância para aqueles fragmentos cuja função é totalmente desconhecida ou foi atribuída com base em sequências muito pequenas.

## 7 – Referências bibliográficas

**Agustí, M.**, 2004, Fruticultura. *Ediciones Mundi-Prensa*, páginas: 258-268.

**Amaro, P.**, 2003, A Protecção Integrada, ISA Press.

**Attallah, C. V., Welchen, E., Pujol, C., Bonnard, G., Gonzales, D. H.**, 2007, Characterization of *Arabidopsis thaliana* genes encoding functional homologues of the yeast metal chaperone Cox19p, involved in cytochrome *c* oxidase biogenesis, *Plant Mol Biol* 65: 343-355.

**Becker, C. M., Burr, T. J., Smith, C. A.**, 1992, Overwintering of conidia of *Venturia inaequalis* in apple buds in New York orchards, *Plant Dis.* 76: 121-126 *cit. in* MacHardy, 1996.

**Bénaouf, G., Parisi, L.**, 1997, Pathogenicity of *Venturia inaequalis* strains from *Malus floribunda* 821: comparasion with race 6 on apple clones. In: *Integrated control of pome fruit diseases*. Proc. Of the 4<sup>th</sup> Workshop, Crovdon, England, 19-23 August 1996. IOBC/WPRS Bulletin Vol. 20: 8-11.

**Bénaouf, G., Parisi, L.**, 2000, Genetics of host-pathogen relationships between *Venturia inaequalis* races 6 and 7 and *Malus* species, *Phytopathology* 90: 236-242.

**Beynon, J. L.**, 1997, Molecular Genetics of Disease Resistance: an End to the 'Gene-for-Gene' Concept? In: *The Gene-for-Gene Relationship in Plant-Parasite Interactions*, CAB International, 359-377.

**Boone, D.M.**, 1971, Genetics of *Venturia inaequalis*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9: 297-318.

**Boudichevskaia, A., Flachowsky, H., Dunemann, F.**, 2009, Identification and molecular analysis of candidate genes homologous to *HcrVf* genes for scab resistance in apple, *Plant Breeding* 128: 84-91.

**Broggini, G. A. L., Bus, V. G. M., Parravicini, G., Kumar, S., Groenwold, R., Gessler, C.**, 2011, Genetic mapping of 14 avirulence genes in an EU-B04 x 1639 progeny of *Venturia inaequalis*, *Fungal Genetics and Biology* 48: 166-176.

**Brown, M. S., Ye, J., Rawson, R. B., Goldstein, J. L.**, 2000, Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans, *Cell* 100: 391-398 *cit. in* Kanakoa *et al.*, 2005.

**Bus, V. G. M., Rikkerink, E. H. A., Caffier, V., Durel, C.-E., Plummer K. M.**, 2011, Revision of the Nomenclature of the Differential Host-Pathogen Interactions of *Venturia inaequalis* and *Malus*, *Annu. Rev. Phytopathol.* 49: 391-413.

- Caño-Delgado, A., Penfield, S., Smith, C., Catley M., Bevan, M.,** 2003, Reduced cellulose synthesis invokes lignification and defense responses in *Arabidopsis thaliana*, *The Plant Journal* 34: 351-362.
- Chang, S., Puryear, J., Cairney, J.,** 1993, A simple and effective method for isolating RNA from pine trees, *Plant Mol. Biol. Rep.* 11: 113-116.
- Chevalier, M., Lespinasse, Y., Renaudin, S.,** 1991, A microscopic study of the different classes of symptoms coded by the *Vf* gene in Apple for resistance to scab (*Venturia inaequalis*), *Plant Pathol.* 40: 249-256.
- Clemens, S., Persoh, D.,** 2009, Multi-tasking phytochelatin synthases, *Plant Science* 177: 266-271.
- Cova, V., Paris, R., Passerotti, S., Zini, E., Gessler, C., Pertot, I., Loi, N., Musetti, R., Komjanc, M.,** 2010, Mapping analysis of four apple receptor-like protein kinases related to *LRPKm1* in *HcrVf2*-transgenic and wild-type apple plants. *Tree Genetics & Genomes* 6: 389-403.
- Crosby, J. A., Janick, J., Pecknold, P. C., Korban, S. S., O'Connor, P. A., Ries, S. M., Goffreda, J., Voordeckers, A.,** 1992, Breeding apples for scab resistance: 1945-1990. *Acta Hort.* 317: 43-70.
- Curi, G. C., Welchen, E., Chan, R. L., Gonzalez, D. H.,** 2005, The leader intron of *Arabidopsis thaliana* genes encoding cytochrome c oxidase subunit 5c promotes high-level expression by increasing transcript abundance and translations efficiency, *J. Exp. Bot.* 56: 2563-2571 *cit. in* Attallah *et al.*, 2007.
- Dangl, J. L., Ritter, C., Gibbon, M., Mur, L. A. J., Wood, J. R., Goss, S., Mansfield, J., Taylor, J. D., Vivian, A.,** 1992, Functional homologs of the *Arabidopsis Rpm 1* disease resistance gene in bean and pea, *The Plant Cell* 4: 1359-1369 *cit. in* Beynon, 1997.
- Darvill, A., Albersheim, P.,** 1984, Phytoalexins and their elicitors: A defence against microbial infection in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 35: 243-275 *cit. in* Dumas *et al.*, 2008.
- Degenhardt, J., Al-Marsi, A. N., Kurkcuoglu, S., Szankowaski, I., Gau, A., E.,** 2005, Characterization by suppression subtractive hybridization of transcripts that are differentially expressed in leaves of apple scab-resistant and susceptible cultivars of *Malus domestica*, *Mol Gen Genomics* 273: 326-335.

- Dumas, B., Bottin, A., Gaulin, E., Esquerré-Tugayé, M.-T.-.,** 2008, Cellulose-binding domains: cellulose associated-defensive sensing partners?, *Trends in Plant Science* 13: 160-164.
- Ebel, J., Scheel, D.,** 1992, Elicitor Recognition and Signal Transduction, In: *Genes Involved in Plant Defense*, Plant Gene Research, Springer-Verlag, Wien New York, 183-205
- Eckey, C.,** 2002, Isolierung und Charakterisierung Pathogen-induzierter Gene der Gerste (*Hordeum vulgare* L.) und Markerentwicklung für den Mlg Resistenzgenlocus mittels cDNA-AFLP, Dissertação de doutoramento, Universidade Justus Liebig, Giessen, 151 pp cit. in Mota & Oliveira, 2008.
- FAO,** www.fao.org (29 de Outubro de 2010)
- Flor, H. H.,** 1971, Current status of the gene-for-gene concept, *Annu. Rev. Phytopathol.* 9: 275-296.
- Fourney, M. R., Miyakoshi, J., Day III, R. S., Paterson, M. C.,** 1988, Northern blotting: efficient RNA staining and transfer, *Focus* 10: 5-7.
- Gabinete de Políticas e Projectos (GPP),** 2007, Sub-Fileira: Maçã, *Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e Pescas*.
- Gabriel, D. W., Rolfe, B. G.,** 1990, Working models of specific recognition in plant-microbe interactions, *Annual Review of Phytopathology* 28: 365-391 cit. in Knogge & Marie, 1997.
- Galli, P., Broggin, G.A.L., Kellerhals, M., Gessler, C., Patocchi, A.,** 2010a, High-resolution genetic map of the *Rvi15* (*Vr2*) apple scab resistance locus. *Mol Breeding* 26: 561-572.
- Galli, P., Broggin, G. A. L., Gessler, C., Patocchi, A.,** 2010b, Phenotypic Characterization of the *Rvi15* (*Vr2*) Apple Scab Resistance, *Journal of Plant Pathology* 92(1): 219-226.
- Gambino, G., Perrone, I., Gribaudo, I.,** 2008, A Rapid and Effective Method for RNA Extraction from Different Tissues of Grapevine and Other Woody Plants, *Phytochem, Anal.* 19: 520-525.
- Gaulin, E., et al.,** 2006, Cellulose binding domains of a *Phytophthora* cell wall protein are novel pathogen-associated molecular patterns, *Plant Cell* 18: 1766-1777 cit. in Dumas et al., 2008.
- Gessler, C.,** 1992, Scab resistance in apple: the minor genes in the *Vf*-resistance, *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 27: 257-263.

- Haezlewood, J. L., Tonti-Filippini, J. S., Gout, A. M., Day, D. A., Whelan, J., Millar, A. H.,** 2004, Experimental analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome highlights signaling and regulatory components, provides assessment of targeting prediction programs, and indicates plant-specific mitochondrial proteins, *Plant Cell* 16: 251-256 *cit. in* Mukherjee *et al.*, 2010.
- Hough, L. F., Shay, J. R., Dayton, D. F.,** 1953, Apple scab resistance from *Malus floribunda* Sieb. *Proc. Amer. Hort. Sci.* 62: 341-347.
- Ivanicka, J., Kellerhals, M., Theiler, R.,** 1996, Evaluation of Scab (*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Wint.) on shoots and detached leaves from in vitro and greenhouse grown plants of the apple (*Malus domestica* Mill.) cultivars *Golden Delicious* and *Florina*, *Gartenbauwissenschaft* 61: 242-248.
- Janick, J., Cummins, J. N., Brown, S. K., Hemmat, M.,** 1996, Apples, In: Janick, J., Moore, J. N., (eds) *Fruit breeding: tree and tropical fruits*, vol I, Wiley, New York, pp 1-77 *cit. in* Galli *et al.*, 2010a.
- Jenks, M. A., Joly, R. J., Peters, P. J., Rich, P. J., Axtell, J. D. Ashworth, E. A.,** 1994, Chemically induced mutation affecting epidermal conductance to water vapor and disease susceptibility in *Sorghum bicolor* (L.), *Moench. Plant Physiol.* 105: 1239-1245 *cit. in* Millar *et al.*, 1999.
- Jones, T. M., Anderson, A. J., Albersheim, P.,** 1972, Host-pathogen interactions. IV. Studies on the polysaccharide-degrading enzymes secreted by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Physiol. Plant Pathol.* 2: 153-166 *cit. in* Mota, 2002.
- Kanaoka, M., M., Urban, S., Freeman, M., Okada, K.,** 2005, An Arabidopsis Rhomboid homolog is an intermembrane protease in plants, *FEBS Letters* 579: 5723-5728.
- Kang, S., Cha, H. W., Chang, M. U., Park, E.,** 2003, Identification of differentially displayed genes of a *Pseudomonas* resistant soybean (*Glycine max*), *Plant Pathology Journal* 19: 10 *cit. in* Mota & Oliveira, 2008.
- Keen, N. T.,** 1990, Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions, *Annual Review of Genetics* 24: 447-463 *cit. in* Knogge & Marie, 1997.
- Keitt, G. W., Jones, I. K.,** 1926, Studies of the epidemiology and control of apple scab, *Wis. Agric. Exp. Stn. Bull.* 73, 194 pp, *cit. in* MacHardy, 1996.
- Kennel, W.,** 1987, Kelchblätter als erste Objekte für Apfelschorf, *Erwerbsobstbau* 29: 36-38 *cit. in* MacHardy, 1996.



- Kennel, W.**, 1989, Biologische Grundlagen für die Bekämpfung des Apfelschorfs, *Obst und Garten* 108: 144-146 *cit. in* MacHardy, 1996.
- Kennel, W., Moosherr, W.**, 1983, Kelchblatt-Schorf, eine gefährliche aber wenig bekannte Erscheinungsform des Apfelschorfs, *Obstbau* 8: 470-472 *cit. in* MacHardy, 1996.
- Knogge, W., Marie, C.**, 1997, Molecular Characterization of Fungal Avirulence, In: *The Gene-for-Gene Relationship in Plant-Parasite Interactions*, CAB International, 329-346.
- Koch, T., Kellerhals, M., Gessler, C.**, 2000, Virulence pattern of *Venturia inaequalis* field isolates and corresponding differential resistance in *Malus x domestica*, *J. Phytopathol.* 148: 357-365 *cit. in* Mota, 2002.
- Kollar, A.**, 1998, Characterization of an endopolygalacturonase produced by the apple scab fungus, *Venturia inaequalis*, *Mycological Res.* 102: 313-319 *cit. in* Mota 2002.
- Kombrink, E., Somssich, I. E.**, 1995, Defense responses of plants to pathogens, In: Andrews, J. H., Tommerrup, I. C., Callow, J. A. (eds) *Advances in Botanical Research*, Vol. 21, Academic Press, London, pp. 1-34 *cit. in* Knogge & Maries, 1997.
- Komjanc M., Festi S., Rizzotti L., Cattivelli L., Cervone F., De Lorenzo G.**, 1999, A leucine-rich repeat receptor-like protein kinase (LRPKm1) gene is induced in *Malus x domestica* by *Venturia inaequalis* infection and salicylic acid treatment, *Plant Mol. Biol.* **40**: 945-957 *cit. in* Mota, 2002.
- Kubo, N., Arimura, S., Tsutsumi, N., Kadowaki, K., Hirai, M.**, 2006, Isolation and characterization of the pea cytochrome c oxidase Vb gene, *Genome* 49: 1481-1489.
- Lamb, C. J.**, 1994, Plant disease resistance genes in signal perception and transduction, *Cell* 76: 419-422 *cit. in* Beynon, 1997.
- Lamport, D. T. A., Northcote, D. H.**, 1960, Hydroxyproline in primary cell walls of higher plants, *Nature* 188: 665-666 *cit. in* Dumas *et al.*, 2008.
- Lawrence, C. B., Bass, W. T., Kovar, J., Qui, J.**, 2006, Profiling of Gene Expression During Early Stages of a Compatible Plant-Oomycete Interaction via cDNA-AFLP® Technology, disponível em <<http://www.licor.com/bio/Posters/536/pdf/536Poster.pdf>> (acesso a 19/11/07) *cit. in* Mota & Oliveira, 2008.
- MacHardy, W.E.**, 1996, Apple scab. Biology, epidemiology and management. APS Press.
- Mansfield, J., Bennet, M., Bestwick, C., Woods-Tor, A.**, 1997, Phenotypic Expression of Gene-for-Gene Interaction Involving Fungal and Bacterial Pathogens: Variation from

Recognition to Response, In: *The Gene-for-Gene Relationship in Plant-Parasite Interactions*, CAB International, 265-291.

**Millar, A. A., Clemens, S., Zachgo, S., Giblin, E. M., Taylor, D. C., Kunst, L.**, 1999, CUT1, an Arabidopsis Gene Required for Cuticular Wax Biosynthesis and Pollen Fertility, Encodes a Very-Long-Chain Fatty Acid Condensing Enzyme, *The Plant Cell* 11:825-838.

**Mota, M.**, 2002, Alternative strategies do fight apple scab, Tese de Doutoramento em Engenharia Agronómica, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa

**Mota, M., Oliveira, C. M.**, 2008, Identificação de genes expressos durante a interacção cv. Florina – *V. inaequalis* por Differential Display-PC,. *Revista de Ciências Agrárias* 31(2): 139-147.

**Mukherjee, A., Carp, M.-J., Zuchman, R., Ziv, T., Horwitz, B., A., Gepstein, S.**, 2010, Proteomics of the response of *Arabidopsis thaliana* to infection with *Alternaria brassicicola*, *Journal of Proteomics* 73: 709-720.

**Nuss, L., Mahé, A., Clark, A. J., Grisvard, J., Dron, M., Cervone, F., De Lorenzo, G.**, 1996, Differential accumulation of PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein) mRNA in two near-isogenic lines of *Phaseolus vulgaris* L. upon infection with *Colletotrichum lindemuthianum*, *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 48: 83-89 cit. in Mota, 2002.

**Paris, R., Cova, V., Pagliarani, G., Tartarini, S., Komjanc, M., Sansavini, S.**, 2009, Expression profiling in *HcrVf2*-transformed apple plants in response to *Venturia inaequalis*, *Tree Genetics & Genoms* 5: 81-91.

**Parisi, L., Lespinasse, Y., Guillaumes, J., Kruger, J.**, 1993, A New Race of *Venturia inaequalis* Virulent to Apples with Resistance due to the *Vf* Gene, *Phytopathology* 83: 533-537.

**Parisi, L.**, 1997, Resistenza del melo alla ticchiolatura e variabilità del potere patógeno di *Venturia inaequalis*, *Inf. Fitopatol.* 6: 5-8 cit. In Bénaouf & Parisi, 2000.

**Patocchi, A., Bigler, B., Koller, B., Kellarhals, M., Gessler, C.**, 2004, *Vr<sub>2</sub>*: a new apple scab resistance gene, *Theor Appl Genet* 109: 1087-1092.

**Pfaffl, M. W.**, 2001, A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR, *Nucleic Acids Research*, 29: 2002-2007.

**Post-Beittenmiller, D.**, 1996, Biochemistry and molecular biology of wax production in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 405-430 cit. in Millar et al., 1999.

- Preece, T. F.**, 1959, A Staining Method for the Study of Apple Scab Infections, *Plant Pathol.* 8: 127-129.
- Qi, Y. C., Liu, W. Q., Qiu, L. Y., Zhang, S. M., Ma, L., Zhang, H.**, 2010, Overexpression of Glutathione S-Transferase Gene Increases Salt Tolerance of *Arabidopsis*, *Russian Journal of Plant Physiology*, 57: 233-240.
- Reicosky, D. A., Hanover, J. W.**, 1978, Physiological effects of surface waxes. I. Light reflectance for glaucous and nonglaucous *Picea pungens*, *Plant Physiol.* 62: 101-104 *cit. in* Millar *et al.*, 1999.
- Roberts, A. L., Crute, I. R.**, 1994, Apple scab resistance from *Malus floribunda* 821 (Vf) is rendered ineffective by isolates of *Venturia inaequalis* from *Malus floribunda*, *Norwegian J. Agric. Sci. Supplement* 17: 403-406.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.**, 1989, Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.**, 1977, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Shay, J. R., Williams, E. B.**, 1956, Identification of three physiologic races of *Venturia inaequalis*, *Phytopathology* 46: 190-193.
- Sauer, P., Muller, M., Kang, J.**, 1998, Quatitation of DNA, fonte: <http://www.qiagen.com/literature/qiagennews/0298/982quant.pdf>, 02 de Setembro de 2011.
- Schenk, P. M., Kazan, K., Manners, J. M., Anderson, J. P., Simpson, R. S., Wilson, I. W., Somerville, S. C., Maclean, D. J.**, 2003, Systemic Gene Expression in *Arabidopsis* during an Incompatible Interaction with *Alternaria brassicicola*, *Plant Physiology*, 132: 999-1010.
- Soriano, J.M., Joshi, S., Groenwold, R., Noordijk, Y., Henken, B., van Kaauwen, M., Schouten, H. J.**, 2009, Identification and Mapping of a New Apple Scab Resistance Gene. *Acta Hort.* 839: 449-452.
- Vance, C. P., Kirk, T. K., Sherwood, R. T.**, 1980, Lignification as a defence mechanism of disease resistance, *Annu. Rev. Phytopathol.* 18: 259-288 *cit. in* Caño-Delgado *et al.*, 2003.
- Vinatzer, B., A., Patocchi, A., Gianfranceschi, L., Tartarini, S., Zhang, H.-B., Gessler, C., Sansavini, S.**, 2001, Apple contains receptor-like genes homologous to the *Cladosporium fulvum* resistance gene family of tomato with a cluster of genes cosegregating with Vf apple scab resistance, *Mol. Plant Microbe Interact.* 14: 505-515.

- Williams, E. B., Kuc, J.**, 1969, Resistance in *Malus* to *Venturia inaequalis*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 7:223-246.
- Williams, E. B., Brown, A. G.**, 1968, A new physiologic race of *Venturia inaequalis*, incitant of apple scab, *Plant Dis. Rep.* 52: 799-801, cit. in Mota, 2002.
- Wise, R. P.**, 2000, Disease resistance: what's brewing in barley genomics, *Plant Dis.* 84: 1160-1170 cit. in Xu & Korban, 2002.
- Xu, M., Korban, S. S.**, 2002, A Cluster of Four Receptor-Like Genes Resides in the *Vf* Locus that Confers Resistance to Apple Scab Disease, *Genetics* 162: 1995-2006.
- Xu, M., Korban, S. S.**, 2004, Somatic variation plays a key role in the evolution of the *Vf* gene family residing in the *Vf* locus that confers resistance to apple scab disease, *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32: 57-65.
- Zybailov, B., Rutschow, H., Friso, G., Rudella, A., Emanuelsson, O., Sun, Q.**, 2008, Sorting signals, N-terminal modifications and abundance of the chloroplast proteome, *PLoS One*, 3: e1994 cit. in Mukherjee et al., 2010.
- Zwiegelhaar, M., Dubery, I. A.**, 2006, Early activation of cell wall strengthening-related gene transcription in cotton by a *Verticillium dahlia* elicitor, *South African Journal of Botany* 72: 467-472.

## 8 – Anexos

### Anexo I - Método de coloração de conídios (Preece, 1959):

- Soluções:

Ácido periodico: 1 % solução em dH<sub>2</sub>O (1g/100 mL de dH<sub>2</sub>O)

*Decolorized Basic Fuchsin*: 1 g de fucsina básica dissolvido em 200 mL de dH<sub>2</sub>O, através de fervura; após o arrefecimento adiciona-se 20 mL N/1 HCl, seguido de 1 g de cristais de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

Solução de ácido sulfuroso: são adicionados 10 mL de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 10% (previamente preparado dissolvendo 10 g/100 mL de dH<sub>2</sub>O) a 200 mL de dH<sub>2</sub>O, seguido de 10 mL N/1 HCl.

- Protocolo:

1 – Submergir as folhas ou lesões no ácido periódico durante 5 min

2 – Lavar em dH<sub>2</sub>O, 5 min

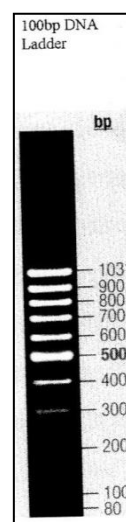
3 – Submergir na solução *Decolorized Basic Fuchsin* durante 5 min

4 – Lavar com ácido sulfuroso, 5 min

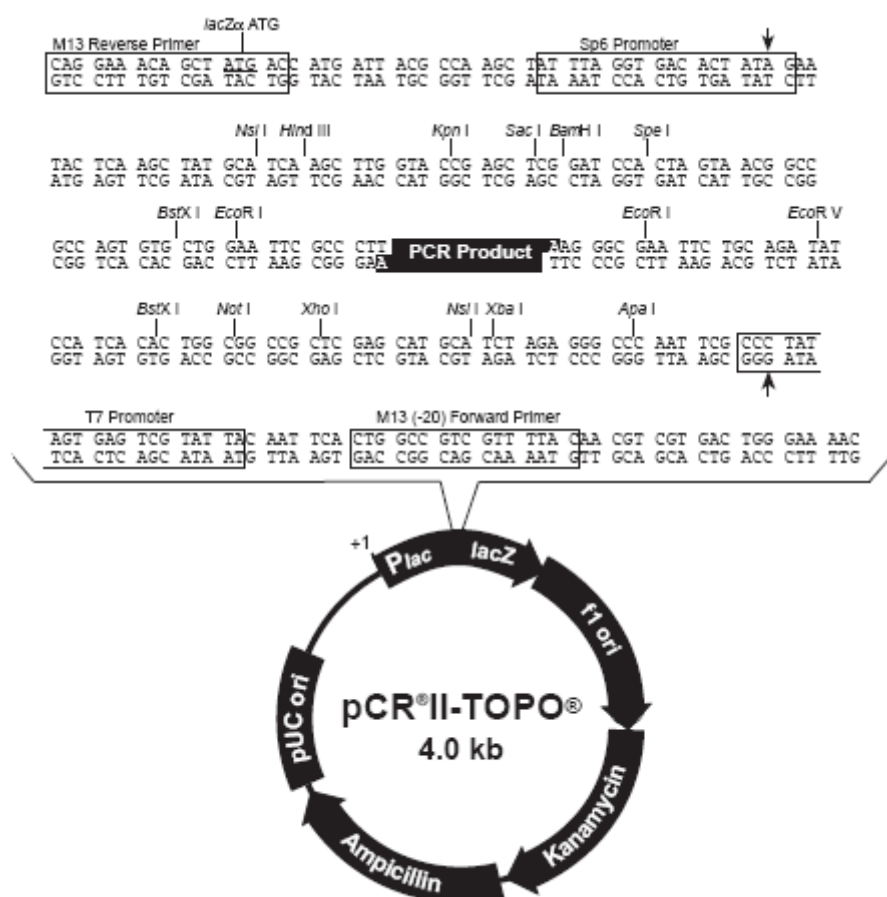
5 – Submergir em dH<sub>2</sub>O, 5 min

6 – Colocar/guardar em dH<sub>2</sub>O, para futura examinação microscópica.

Anexo II – Marcador 100 bp Gene Ladder



### Anexo III -Sequência do plasmídeo:



Anexo IV - Resultados obtidos por qPCR:**Quadro I:** Resultados de Gala<sub>H2O</sub> e Gala<sub>Vi</sub> às 48 h

Iniciadores	Gala <sub>H2O</sub> 48 h		Gala <sub>Vi</sub> 48h	
	C(t)	Média	C(t)	Média
18S	22,64	23,02	21,93	22,02
	23,39		22,11	
	23,04		22,01	
PGIP	26,16	26,39	26,69	27,19
	26,37		26,98	
	26,65		27,89	
M9	32,51	32,57	31,11	31,38
	32,17		31,56	
	33,02		31,48	
M10	33,12	33,04	30,06	30,13
	32,84		30,22	
	33,16		30,11	
N3021	37,01	38,53	34,14	34,93
	39,16		36,11	
	39,42		34,53	
N910	35,74	35,67	35,53	34,86
	35,24		34,02	
	36,04		35,02	
M3	26,89	26,66	26,60	26,61
	26,63		26,84	
	26,47		26,38	
M6	34,42	34,25	34,73	35,10
			34,91	
	34,07		35,67	
M13	39,68	38,76	35,19	36,58
	38,66		36,36	
	37,95		38,19	
N54	35,55	34,77	32,67	32,80
	34,37		32,67	
	34,39		33,06	



**Quadro II:** Resultados de  $Gala_{H_2O}$  e  $Gala_{Vi}$  às 72 h

Iniciadores	Gala <sub>H<sub>2</sub>O</sub> 72 h		Gala <sub>Vi</sub> 72h	
	C(t)	Média	C(t)	Média
18S	20,48	20,58	21,28	21,26
	20,80		21,28	
	20,45		21,23	
MDPGIP	26,71	26,85	26,21	26,35
	26,90		26,38	
	26,95		26,45	
M9	29,81	29,89	27,76	28,09
	29,88		28,20	
	30,00		28,30	
M10	29,90	30,07	27,73	27,86
	30,15		27,92	
	30,15		27,94	
N3021	32,10	32,11	30,80	30,80
	32,26		31,06	
	31,98		30,53	
N910	30,40	30,98	32,00	31,64
	31,05		31,26	
	31,49		31,67	
M3	27,36	27,05	27,40	27,37
	27,42		27,38	
	26,38		27,34	
M6	29,33	29,54	29,35	29,42
	29,78		29,33	
	29,51		29,57	
M13	31,48	32,30	31,39	31,51
	31,79		31,15	
	33,64		31,98	
N54	30,18	30,31	28,49	28,53
	30,29		28,42	
	30,46		28,67	

**Quadro III:** Resultados de Gala<sub>H2O</sub> e de Gala<sub>H2O</sub> às 72 h

Iniciadores	Gala <sub>H2O</sub> 96 h		Gala <sub>Vi</sub> 96h	
	C(t)	Média	C(t)	Média
18S	20,61	20,48	20,24	21,57
	20,56		20,06	
	20,27		24,42	
MDPGIP	26,80	26,71	25,54	25,66
	26,67		25,61	
	26,66		25,84	
M9	28,59	28,72	26,30	26,53
	28,89		26,55	
	28,67		26,76	
M10	29,05	29,11	26,98	26,99
	28,89		26,92	
	29,40		27,07	
N3021	31,82	31,95	30,97	31,12
	32,63		31,10	
	31,41		31,29	
N910	30,58	30,74	29,13	29,38
	30,86		29,37	
	30,79		29,64	
M3	30,61	28,74	28,25	27,58
	29,52		27,98	
	26,08		26,50	
M6	29,13	29,27	28,73	28,72
	29,29		28,80	
	29,39		28,62	
M13	31,08	31,25	30,74	30,47
	31,42		30,25	
			30,42	
N54	28,32	28,42	27,42	27,50
	28,44		27,54	
	28,49		27,55	

**Quadro IV:** Resultados de  $Flo_{H_2O}$  e de  $Flo_{Vi}$ 

Iniciadores	$Flo_{H_2O}$		$Flo_{Vi}$	
	C(t)	Média	C(t)	Média
18S	23,38	23,24	26,69	26,82
	23,13		25,52	
	23,22		28,26	
MDPGIP	29,00	29,00	27,09	27,19
	29,02		27,15	
	28,98		27,33	
M9	33,41	33,76	31,60	31,36
	33,86		31,38	
	34,02		31,10	
M10	33,23	33,52	33,69	33,31
	33,56		33,17	
	33,78		33,07	
N3021	38,09	37,51	36,82	38,61
	37,57		39,55	
	36,88		39,46	
N910	35,87	35,71	33,43	33,55
	35,44		33,66	
	35,82			